



Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de pathologies humaines : Application au transporteur ATP7B et au récepteur 5HT2B

Claude Hercend

► To cite this version:

Claude Hercend. Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de pathologies humaines : Application au transporteur ATP7B et au récepteur 5HT2B. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T005 . tel-00708236

HAL Id: tel-00708236

<https://theses.hal.science/tel-00708236>

Submitted on 14 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris V

Discipline ou Spécialité : Biologie Cellulaire-Biochimie

Ecole Doctorale Gc2ID

Présentée et soutenue publiquement le 16 Mai 2012

par

Claude HERCEND

**« Contribution de la modélisation moléculaire à
l'étude de pathologies humaines : Application au
transporteur ATP7B et au récepteur 5-HT2B »**

COMPOSITION DU JURY

Président :	Pr. Odile KELLERMANN
Rapporteur :	Pr. François MAUREL
Rapporteur :	Dr. Odile SPREUX-VAROQUAUX
Examineur :	Pr. Ronan BUREAU
Examineur :	Dr. France WOIMANT
Directeur de thèse :	Pr. Philippe MANIVET

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Philippe Manivet qui a accepté d'être mon directeur de thèse et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces 4 années de thèse.

Je remercie très sincèrement Jean-Marie Launay qui m'a accueilli dans le service de Biochimie depuis presque 5 ans maintenant. A vos cotés, j'ai saisi le sens des mots rigueur et passion ou la curiosité scientifique nourrit une recherche qui doit permettre de comprendre mais aussi de soigner. J'ai pu affirmer et affiner avec nos nombreuses discussions ma vocation d'hospitalier et les valeurs que nous partageons. Merci pour la constance de votre soutien sans lequel je n'aurais pu terminer cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Odile Spreux-Varoquaux et François Maurel pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur de ma thèse à la croisée de la modélisation et de la biologie.

Je remercie aussi Odile Kellermann qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à France Woimant qui a suivi le projet modélisation dans la maladie de Wilson depuis le début et qui participe aussi à mon jury de thèse.

Je remercie enfin Ronan Bureau pour sa participation à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr Cohen-Solal, directeur de l'unité INSERM U942, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son unité.

Je remercie chaleureusement mes collègues du laboratoire de Biochimie ou j'ai travaillé pendant les 4 années de ma thèse. Nous avons travaillé en refaisant le monde avec joie et bonne humeur pendant les journées, les nuits et les WE de garde. Ces moments ne s'oublient pas.

Je remercie mes partenaires et ami-e-s de Modélisation pour leur bonne humeur, leur rigueur scientifique et leur disponibilité. Merci à Alex, Lulu, les 2 Josephs, Cyril, Guillaume, Aixiao, Karim et Pierrick. Sans votre aide, je n'aurais jamais pu finir cette thèse qui a été une aventure au royaume de l'atome.

A la mère Michèle et la clairette pour leur soutien inébranlable dans les épreuves.
A la marmotte pour tout le reste que la langue ne pourra jamais retranscrire.

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	7
LISTES DES TABLEAUX ET ANNEXES	7
ABREVIATIONS	9
AVANT PROPOS	13
CHAPITRE I. MODELISATION MOLECULAIRE	15
I. MODELISATION MOLECULAIRE	16
1. GENERALITES	16
2. MECANIQUE MOLECULAIRE	17
2.1. <i>Le champ de force</i>	17
2.1.1. Energie de liaison.....	19
2.1.2. Energie de flexion	19
2.1.3. Energie de torsion	20
2.1.4. Energie d'interaction entre atomes non liés	21
2.1.4.1. Energie de van der Waals.....	21
2.1.4.2. Energie électrostatique	22
2.2. <i>Minimisation d'énergie</i>	22
2.2.1. Algorithme de la plus grande pente	24
2.2.2. Algorithme du gradient conjugué	25
3. DYNAMIQUE MOLECULAIRE	26
3.1. <i>Généralités</i>	26
3.2. <i>Les ensembles thermodynamiques</i>	28
3.3. <i>La solvation de la protéine</i>	29
3.4. <i>Traitement des conditions périodiques</i>	30
3.5. <i>Calcul des interactions non liantes</i>	31
3.5.1. Méthode de la valeur seuil	32
3.5.2. La sommation d'Ewald	33
3.5.3. Particule Mesh Ewald.....	33
3.6. <i>Analyses usuelles en dynamique moléculaire</i>	34
3.6.1. Ecart quadratique moyen (RMSD)	34
3.6.2. Rayon de giration	35
3.6.3. Fluctuations atomiques (RMSF)	35
3.6.4. Les liaisons hydrogènes	36
4. AMARRAGE MOLECULAIRE.....	37
4.1. <i>Méthode de recherche conformationnelle</i>	38
4.2. <i>Fonction de score</i>	40

5.	MODELISATION PAR HOMOLOGIE	41
5.1.	<i>Principe</i>	41
6.	CONCLUSION.....	42
CHAPITRE II. ETUDE DU TRANSPORTEUR HUMAIN ATP7B		44
II- ETUDE DU TRANSPORTEUR HUMAIN ATP7B		45
1.	INTRODUCTION	45
2.	LES ATPASES DE TYPE P.....	45
2.1.	<i>Généralités</i>	45
2.2.	<i>Cycle réactionnel</i>	48
3.	L'ATP7B.....	50
3.1.	<i>Rôle physiologique</i>	50
3.2.	<i>Implication dans la maladie de Wilson</i>	51
3.2.1.	Généralités	51
3.2.2.	Manifestations cliniques	52
3.2.3.	Données biologiques	53
3.2.4.	Diagnostic génétique	54
3.2.5.	Etude de la pathogénicité des mutations.....	55
3.2.6.	Traitement	56
4.	ETUDE DE MODELISATION MOLECULAIRE.....	58
4.1.	<i>Données préliminaires</i>	58
4.2.	<i>Etude de la dynamique de liaison à l'ATP (article 1)</i>	59
4.3.	<i>Résultats</i>	80
4.4.	<i>Discussion et Perspectives</i>	81
5.	CONCLUSION.....	86
CHAPITRE III. ETUDE DU RECEPTEUR 5-HT_{2B} HUMAIN		87
III- ETUDE DU RECEPTEUR HUMAIN 5-HT_{2B}		88
1.	INTRODUCTION	88
2.	LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE	88
2.1.	<i>La sérotonine</i>	88
2.1.1.	Biosynthèse, stockage et libération de la 5-HT	89
2.1.2.	Inactivation de la 5-HT	91
2.1.2.1.	Recapture de la sérotonine (transporteur).....	91
2.1.2.2.	Dégradation enzymatique.....	93
2.1.3.	Sites d'actions de la sérotonine.....	94
2.1.3.1.	Rôle dans le SNC	94
2.1.3.2.	Rôle dans le tractus gastro-intestinal	95
2.1.3.3.	Rôle cardiovasculaire.....	96

2.1.3.4.	Rôle dans le métabolisme osseux	97
2.1.3.5.	Rôle embryologique.....	99
2.1.3.6.	Autres rôle de la 5-HT.....	99
2.2.	<i>Les récepteurs à la sérotonine.....</i>	<i>100</i>
3.	LE RECEPTEUR 5-HT _{2B}	101
3.1.	<i>Découverte.....</i>	<i>101</i>
3.2.	<i>Pharmacologie</i>	<i>102</i>
3.3.	<i>Voies de couplage</i>	<i>102</i>
3.3.1.	Voie de signalisation classique : G _q /G ₁₁	103
3.3.2.	Voie mitogénique et transactivation	103
3.3.3.	Voie d'activation des NO synthases.....	104
3.3.4.	Voie de signalisation anti-apoptotique.....	105
3.3.5.	Voie d'activation de la phospholipase A2.....	105
3.3.6.	Voie de couplage aux métalloprotéases (MMP).....	106
3.4.	<i>Fonctions physiopathologiques.....</i>	<i>106</i>
3.4.1.	Sites d'expression chez l'adulte	106
3.4.2.	Rôle embryologique.....	107
3.4.3.	Rôle au niveau du tractus gastro-intestinal.....	107
3.4.4.	Rôle vasculaire	108
3.4.4.1.	Rôle cardiaque	108
3.4.4.2.	Rôle neurovasculaire : migraine	110
3.4.4.3.	Hypertension artérielle systémique.....	111
3.4.4.4.	Rôle dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	111
3.4.5.	Rôle au niveau osseux.....	112
3.4.6.	Rôle au niveau du SNC	113
3.4.7.	Génétique.....	114
3.4.8.	Autres rôles	114
3.5.	<i>Données de modélisation moléculaire</i>	<i>115</i>
4.	LE 5-HT _{2B} R DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (HTAP).....	122
4.1.	<i>Généralités sur l'HTAP</i>	<i>122</i>
4.2.	<i>Hypothèse sérotoninergique dans l'HTAP.....</i>	<i>125</i>
4.2.1.	Rôle de la 5-HT.....	125
4.2.2.	Rôle du SERT.....	127
4.2.3.	Rôle des récepteurs sérotoninergiques	129
4.3.	<i>Rôle du 5-HT_{2B}R dans l'HTAP.....</i>	<i>130</i>
4.4.	<i>Etude du polymorphisme N-terminal R6G/E42G (article 2).....</i>	<i>133</i>
4.4.1.	Résultats	168
4.5.	<i>Discussion et perspectives</i>	<i>169</i>
4.5.1.	Rôle de la partie N-terminale du récepteur 5-HT _{2B}	169
4.5.2.	Le 5-HT _{2B} R dans l'hypothèse sérotonuergique de l'HTAP médicamenteuse	181
4.5.3.	Donnés récentes sur le rôle du 5-HT _{2B} R dans l'addiction	187

5. CONCLUSION.....	190
CONCLUSION GENERALE.....	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191
ANNEXES	210

Liste des figures

Figure 1. Décomposition énergétique classique d'un champ de force.....	18
Figure 2. Distance r entre deux atomes i et j	19
Figure 3. Angle θ permettant le calcul de l'énergie de flexion séparant les atomes i , j et k	20
Figure 4. Angle de torsion (ou dièdre) ϕ entre quatre atomes de carbone.....	20
Figure 5. Représentation de la courbe d'énergie de van der Waals sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones.	22
Figure 6. Représentation de la courbe d'énergie d'un espace conformationnel à une dimension.....	23
Figure 7. Schématisation d'une minimisation par la méthode de la plus grande pente dans un espace 3D.	25
Figure 8. Comparaison entre deux méthodes de minimisation : méthode SD et du gradient conjugué.....	25
Figure 9. Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques limites et détail sur les mouvements de particules.	31
Figure 10. Représentation de l'énergie de van der Waals selon différentes méthodes de lissage.....	32
Figure 11. Représentation des différentes étapes pour le calcul des interactions électrostatiques par la méthode PME.	34
Figure 12. Paramètres géométriques d'une liaison hydrogène avec les paramètres utilisés dans le programme Gromacs.	37
Figure 13. Organisation structurale des P-ATPases.	47
Figure 14. Cycle réactionnel schématisé des P-ATPases.	49
Figure 15. Cycle cellulaire du cuivre dans l'hépatocyte.....	51
Figure 16. Principales mutations des 21 exons du gène ATP7B décrites dans la maladie de Wilson	55
Figure 17. Représentation 3D du domaine N en présence du magnésium et de l'ATP.	59
Figure 18. Schéma général de la biosynthèse et du catabolisme de la sérotonine.....	91
Figure 19. Mécanisme proposé de transport de la sérotonine par le SERT.....	93
Figure 20 Différentes voies de couplages du récepteur 5-HT _{2B}	103
Figure 21. Mécanisme moléculaire proposé dans l'apparition de valvulopathies induites par le récepteur 5-HT _{2B}	110
Figure 22. Organisation structurales des différentes classes de RCPG.	116
Figure 23. Site de liaison du récepteur 5-HT _{2B} proposé par modélisation moléculaire.....	117
Figure 24. Modes d'activation des récepteurs 5-HT _{2B} humain et murin.....	119
Figure 25. Evolution de la distance de deux ponts salins (D152-R169,R153-E253) pour différentes simulations du 5-HT _{2BR}	121
Figure 26. Modifications observées au cours de l'HTAP dans les artères pulmonaires de faible diamètre.....	125

Listes des tableaux et annexes

Annexe 1 Caractéristiques générales des récepteurs sérotoninergiques.....	210
Annexe 2 Exemples de séquences N-terminales de différents RCPG de classe A	212
Annexe 3 Etude génétique réalisée sur le SERT et le 5-HT _{2B} dans une cohorte de 86 patients atteints d'HTAP.	213

<i>Annexe 4 Résultats de l'étude préliminaire obtenus pour le séquençage du récepteur 5-HT_{2B} dans une population d'addicts.....</i>	<i>214</i>
--	------------

Abréviations

3D : Tridimensionnelle

5-CT : 5-carboxamidotryptamine

5-HIAA : acide hydroxy-5-indolyl acétique

5-HT : 5-hydroxytryptamine (ou sérotonine)

5-HTP : 5-hydroxytryptophane

5-HTR : récepteur à la 5-HT

5-HTT : transporteur de la sérotonine

aa : acides aminés

AADC : décarboxylase des acides aminés aromatiques

AMP_c : adénosine monophosphate cyclique

ATOX1 : protéine antioxydante 1

ATP : adénosine triphosphate

BMP : protéine morphogénétique osseuse

BMPR2 : récepteur au BMP de type 2

BR : bactériorhodopsine

CML-AP : cellules musculaires lisses de la paroi des artères pulmonaires

COX : cyclo-oxygénase

Cp : céruléoplasmine

CPL : conditions periodiques aux limites

CREB : facteur de transcription dépendant de l'AMP_c

CRF : corticolibérine

CTR1 : protéine de transport du cuivre n°1

DLA : domaine de Liaison à l'ATP

DLC : domaine de liaison au cuivre

DLM : domaine de liaison au métal

DM : dynamique moléculaire

DOPA : dihydroxyphénylalanine

ELISA : « enzyme- linked immunosorbent assay »

ERK : « extracellular signal-related kinase »

GABA : acide γ -aminobutyrique

GMP_c : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate
 GWAS : « genome wide association studies »
 HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
 HTM : hélice transmembranaire
 IP₃ : inositol triphosphate
 LRP5 : protéine liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité n°5
 kDa : kiloDaltons
 MAO : monoamine oxydase
 MAPK : « mitogen-activated protein kinase »
 MDMA : 3,4-méthylène-dioxy-N-méthylamphétamine
 miR : micro ARN
 MLM : motif de liaison au métal
 MM : mécanique moléculaire
 MMP : métalloprotéase matricielle
 NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
 NF-κB : « nuclear factor kappa B »
 NOS : « nitric oxide synthase »
 P-ATPase : atpase de type P
 PAR : « protease activated receptor »
 PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
 PKC : protéine Kinase C
 PME : « particule mesh ewald »
 R_g : rayon de giration
 RCPG : récepteur couplé aux protéines G
 RH : rhodopsine bovine
 RMSD : « root mean square deviation » (ou écart quadratique moyen)
 RVP : résistance vasculaire pulmonaire
 RX : rayons X
 SERCA : Ca²⁺-ATPase du reticulum sarco-endoplasmique
 SERT : transporteur de la sérotonine (voir aussi 5-HTT)
 SD : « steepest descent »
 SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide
 SSRI : « serotonin selective reuptake inhibitor »

TETA : triéthylènetétramine

TGF- β : transforming growth factor beta

TGI : tractus gastro-intestinal

TNF- α : « tumor necrosis factor-alpha »

TPH : tryptophane hydroxylase

Trp : tryptophane

TSH : thyroestimuline

WT : wild-type

Résumé

La modélisation moléculaire est un outil bioinformatique permettant l'étude de phénomènes biologiques à l'échelle atomique. Nous avons appliqué cet outil à l'étude de pathologies humaines pour lesquelles le service a une expertise reconnue : la maladie de Wilson et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).

Certaines mutations du gène du transporteur à cuivre ATP7B sont à l'origine de la maladie de Wilson qui se caractérise par une accumulation de cuivre dans un grand nombre de tissus. Cette maladie qui peut mettre en cause le pronostic vital des patients dispose d'un traitement relativement efficace. Pour autant, la maladie de Wilson reste une maladie dont le diagnostic et le pronostic est rendu difficile par le très grand nombre de mutations et de polymorphismes décrits. Dans ce contexte, nous avons mis au point un modèle tridimensionnel (3D) du domaine N qui est le site de liaison à l'ATP de l'ATP7B. Le site de liaison proposé a été validé expérimentalement et implique une triade d'acides aminés chargés négativement (E1152, D1167, D1171) coordonnés par un ion Mg^{2+} . L'étude de dynamique moléculaire montre un effet stabilisateur de et propose un rôle dans la liaison au nucléotide pour une grande boucle non structurée (T1114-A1143). Ce travail pose les bases du développement d'un outil *in silico* pour l'étude des mutations de l'ATP7B.

La seconde partie de la thèse concerne l'étude en modélisation moléculaire de la partie N-terminale du récepteur sérotoninergique 5-HT_{2B} impliqué dans l'HTAP. L'étude est basée sur la présence des polymorphismes R6G et E42G dans la région N-terminale (N-ter) du récepteur au sein d'une cohorte de 91 patients atteints d'HTAP. Ces polymorphismes sont retrouvés majoritairement chez ceux qui ont consommé des anorexigènes dont certains métabolites sont des agonistes du récepteur 5-HT_{2B}. L'étude fonctionnelle du récepteur a montré une augmentation du couplage (intrinsèque et agoniste-dépendant) associé à une augmentation d'affinité pour les agonistes. Nous proposons un repliement original du Nter lui permettant d'interagir directement au niveau du site de fixation des agonistes pour empêcher l'activation du récepteur. Le modèle 3D ainsi que le rôle du Nter ont été validés par différentes expériences (mutagenèse dirigée, construction de chimères du N-ter). Nos résultats confirment l'implication du récepteur 5-HT_{2B}R dans l'HTAP induite par les anorexigènes. Plus généralement, nous proposons également un rôle pour la partie N-terminale dans le processus d'activation des récepteurs couplés aux protéines G.

Avant propos

La modélisation moléculaire est de plus en plus utilisée aujourd'hui pour étudier les réactions chimiques, la dynamique des protéines et reste moins utilisées pour l'élucidation de mécanismes physiopathologiques à l'origine des pathologies humaines que ce soit en terme diagnostique ou thérapeutique. L'objet essentiel de cette thèse est donc de tenter de situer les apports potentiels de la modélisation moléculaire en milieu hospitalier.

Comme toute technologie, la modélisation possède des limites. Nous décrirons dans un premier temps, les principes fondamentaux de la modélisation moléculaire en revenant plus en détail sur la dynamique moléculaire.

La seconde partie sera consacrée à un premier exemple d'application de la modélisation à la maladie de Wilson, maladie pour laquelle le service de biochimie de l'hôpital fait partie du centre national de référence. L'étude par modélisation moléculaire de la protéine ATP7B dont la fonction de transport du cuivre est perturbée voire abolie dans cette maladie doit permettre de trancher le rôle du magnésium dans la fixation de l'ATP au domaine N de la protéine. Ceci alors que le site de fixation du nucléotide n'a pas pu être clairement défini. La première étape est de réaliser un modèle 3D du domaine N sauvage. Nous nous intéresserons à ce titre à la dynamique de la liaison du domaine N avec l'ATP et au rôle de l'ion magnésium dans le processus de fixation du nucléotide à la protéine. A terme, la modélisation a pour but de devenir une outil d'aide au diagnostic dans une maladie génétique où le nombre de mutations est très importants (> 400 mutations décrites) et où l'absence de corrélation génotype/phénotype retarde la prise en charge des malades. La réalisation de modèles 3D de la protéine ATP7B devrait permettre d'étudier sa fonction et de prévoir l'impact des mutations.

Par ailleurs, nous travaillons également dans le service sur la modélisation d'un récepteur important du système sérotoninergique : le récepteur 5-HT_{2B} (5-HT_{2BR}) .

Il s'agit de comprendre l'impact de polymorphismes mise en évidence sur la partie N-terminale du 5-HT_{2BR} dans une cohorte de patients atteints d'HTAP. A ce titre, nous travaillons en collaboration avec les cliniciens du centre de référence de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) situé à l'hôpital Bécélère.

Le rôle de ce récepteur dans la physiopathologie de cette maladie grave, sans thérapeutique efficace à long terme, est suspecté depuis quelques années. La modélisation a ici pour but de proposer un mécanisme d'interaction au niveau atomique permettant d'expliquer les modifications pharmacologiques observées. Ceci permettra en outre d'élargir la discussion afin de mettre en perspective le rôle de la partie N-terminale dans la fonction des récepteurs couplés aux protéines G.

Chapitre I.

Modélisation

Moléculaire

I. Modélisation Moléculaire

1. Généralités

Les méthodes théoriques utilisées pour l'obtention de modèles permettant de comprendre et de prédire la structure, les propriétés physico-chimiques et les interactions moléculaires sont connues sous le nom de « Modélisation Moléculaire ». Ces méthodes permettent de fournir des informations complémentaires à celles obtenues par des méthodes expérimentales. En effet, le premier domaine d'application de la modélisation moléculaire a été historiquement celui de la chimie. Comme il sera développé plus en détail dans ce chapitre, la modélisation offre également de nombreuses opportunités en biologie expérimentale. Ainsi, la modélisation moléculaire, permet d'obtenir par exemple la structure de l'état de transition d'une réaction chimique donnée, ce qui est difficile, voire impossible, pour la chimie expérimentale. Le nombre d'études théoriques utilisant ces techniques, pour guider l'expérience ou expliciter des observations expérimentales, a très fortement augmenté ces dernières années (Van Der Kamp *et al.*, 2008). Une recherche effectuée sur la base de données scientifiques orientée biologie *Pubmed* sur les années 2010-2011 recense plus de 1800 études.

L'augmentation toujours plus rapide de la puissance et de la capacité de calcul mais aussi de la communication (*réseaux*), a favorisé son développement. A chaque système correspond une méthode adéquate. L'utilisation de chaque méthode doit intégrer les hypothèses (validité de la reproduction des valeurs expérimentales), les approximations (champ de force utilisé) et les limitations du modèle lui-même (ex : temps de simulation). Les méthodes utilisées sont très nombreuses : chimie quantique, mécanique moléculaire, dynamique moléculaire (pour une description approfondie voir Leach, 2001).

Pour ce travail de thèse, je me contenterai de décrire les méthodes les plus couramment utilisées en biologie pour l'étude des protéines comme la dynamique moléculaire, l'arrimage moléculaire et la modélisation par homologie.

2. Mécanique moléculaire

En mécanique moléculaire (MM), la description des systèmes se base sur un formalisme proche de la physique classique. En effet, les atomes sont considérés comme des sphères dures incompressibles, portant des charges partielles fixes, liées les uns aux autres par des liaisons assimilées à des ressorts. La mécanique moléculaire s'appuie sur le champ de force qui est une somme de termes énergétiques, harmoniques, représentant les interactions liantes et non-liantes qui ont lieu à l'intérieur d'une molécule ou entre plusieurs molécules. Les paramètres du champ de force sont obtenus à partir de données expérimentales telles que l'étude par spectroscopie infrarouge de la vibration des liaisons ou encore la mesure de la longueur des liaisons par cristallographie aux rayons X. Des méthodes *ab initio* telle que la mécanique quantique peuvent également apporter des informations sur les angles de torsions ou sur la fréquence de vibration des liaisons par exemple.

2.1. Le champ de force

L'énergie totale du système est calculée de façon empirique par l'intermédiaire du champ de force. En effet, l'existence de paramètres dans les différents termes énergétiques du champ de force explique pourquoi les énergies relatives calculées n'ont pas de valeur physique dans l'absolu, seules les différences d'énergies relatives peuvent être interprétées.

L'énergie totale peut être décomposée en deux termes :

$$E_{totale} = E_{liante} + E_{non-liante} \quad (1)$$

L'énergie liante regroupe les atomes liés par au plus deux ou trois liaisons covalentes. Elle se décompose en plusieurs termes :

$$E_{liante} = E_{liaison} + E_{flexion} + E_{torsion} \quad (2)$$

Au delà, l'énergie est calculée sous forme d'énergie non-liante :

$$E_{non-liante} = E_{elec} + E_{vdW} \quad (3)$$

Les termes des équations 2 et 3 seront abordés en détail dans les paragraphes suivants. La Figure 1 présente une vue schématique de la décomposition énergétique globale d'un champ de force. Le choix du champ de force dépend de la nature du système étudié. Une

des principales difficultés de la MM est de choisir le champ de force adéquat pour la modélisation du système moléculaire d'intérêt. La spécificité de chaque champ de force va dépendre du nombre de termes présents dans l'équation générale, termes qui augmentent en général avec la complexité du champ de force.

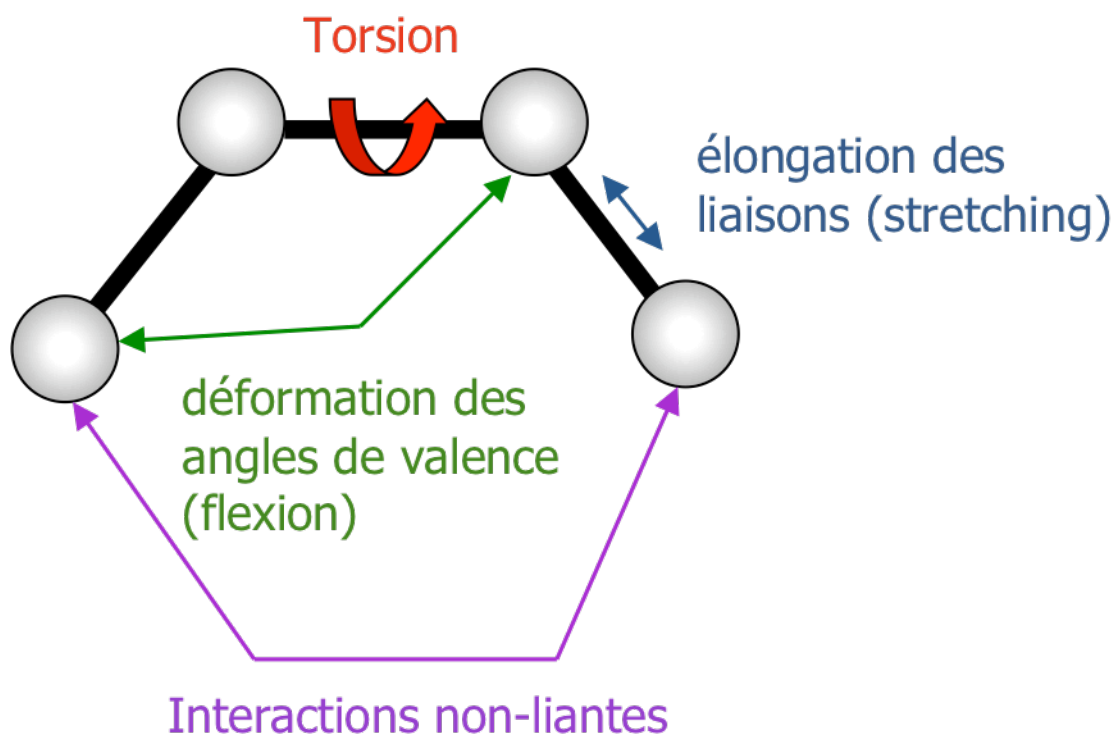


Figure 1. Décomposition énergétique classique d'un champ de force. Les atomes sont représentés par des sphères grises, les liaisons par des traits noirs (voir ci-dessous pour la définition précise des différents termes).

Parmi les champs de force les plus utilisés, on peut citer :

- Tripos (molécules organiques) (Clark *et al.*, 1989)
- Amber (anciennement réservé aux acides nucléiques, maintenant appliqué à l'ensemble des biomacromolécules) (Weiner *et al.*, 1986, Cornell *et al.*, 1995)
- Charmm (utilisation initiale pour les protéines, étendue maintenant à l'ensemble des biomacromolécules) (Brooks *et al.*, 1983, MacKerell *et al.*, 1998)
- MM2/MM3/MM4 (molécules organiques) (Allinger *et al.*, 1989, 1996)

La description du champ de force est spécifique au programme utilisé. Dans notre cas, nous nous intéressons plus particulièrement au champ de force du logiciel CHARMM (CHARMM 27) et au champ de force général du logiciel Amber (GAFF) qui ont été utilisés pour ce travail.

2.1.1. Energie de liaison

L'énergie d'une liaison covalente entre deux atomes est calculée par analogie avec un oscillateur harmonique à partir de la distance entre deux atomes (Figure 2) :

$$E_{liaison} = \sum k_b (r - r_0)^2 \quad (4)$$

avec i et j deux atomes séparés par une distance r , r_0 la distance à l'équilibre et k_b la constante de force déterminée en comparant des données expérimentales après une procédure de recherche conformationnelle. Ces deux derniers paramètres dépendent du type des atomes i et j .

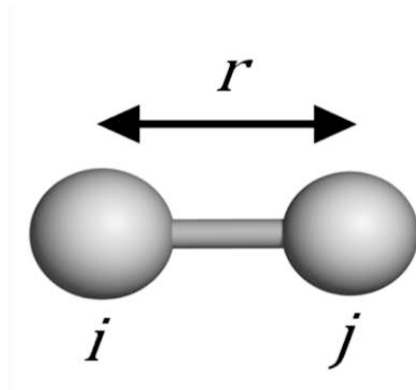


Figure 2. Distance r entre deux atomes i et j

2.1.2. Energie de flexion

L'énergie de flexion (ou *bending*) représente l'énergie de déformation des angles de valence. Ce terme est calculé à partir de l'angle θ formé par trois atomes liés par des liaisons covalentes (Figure 3). Il est calculé à partir d'un oscillateur harmonique comme le montre l'équation suivante :

$$E_{flexion} = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (5)$$

avec i, j et k trois atomes séparés par un angle θ , θ_0 l'angle à l'équilibre et k_θ la constante de force.

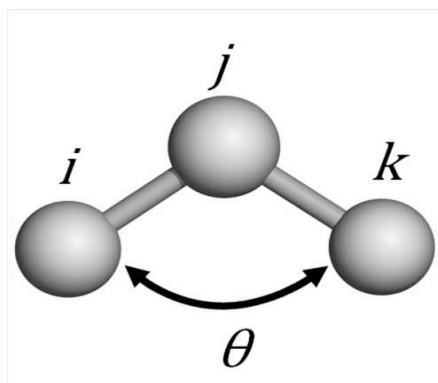


Figure 3. Angle θ permettant le calcul de l'énergie de flexion séparant les atomes i, j et k .

2.1.3. Energie de torsion

L'énergie de torsion (ou *stretching*) représente le terme de rotation autour des liaisons.

Pour quatre atomes, séparés par trois liaisons, les paramètres tels que la barrière énergétique de rotation V_n , le nombre de minima énergétiques n , la phase à l'origine γ et l'angle dièdre ϕ (

Figure 4) permettent de calculer l'énergie de torsion par l'équation suivante :

$$E_{torsion} = \sum \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (6)$$

Enfin, il existe des champs de force où des termes supplémentaires dépendant de coordonnées internes (liaison, angle, angle dièdre) peuvent être ajoutés.

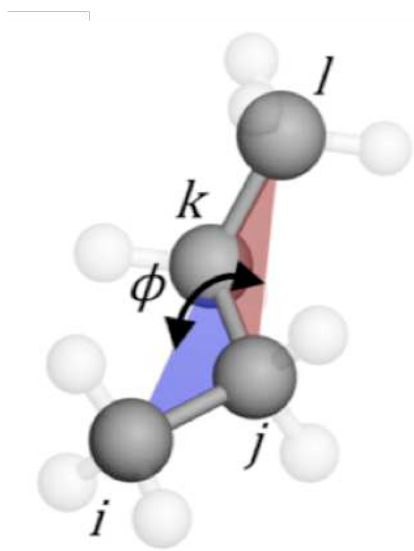


Figure 4. Angle de torsion (ou dièdre) ϕ entre quatre atomes de carbone.

2.1.4. Energie d'interaction entre atomes non liés

Pour toutes les paires d'atomes séparées par plus de trois liaisons, l'énergie d'interaction est considérée comme non « liante » dans la mesure où cette énergie est incluse implicitement pour les atomes d'un même angle dièdre dans le terme d'énergie liante. Ce terme peut être décomposé en deux termes (Equation 3).

2.1.4.1. Energie de van der Waals

L'énergie de van der Waals est calculée à partir des interactions électriques de faible intensité comme les interactions dipôle-dipôle, dipôles induits et dipôles instantanés. L'énergie de van der Waals, correspondant à l'interaction entre atomes non liés situés à une distance donnée, est exprimée sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones. Elle est calculée grâce à l'équation ci-dessous :

$$E_{vdW} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (7)$$

avec r_{ij} la distance entre les atomes i et j , ϵ le paramètre de Lennard-Jones qui représente la profondeur du puits de potentiel et σ la distance à laquelle l'énergie de van der Waals est nulle. Le premier terme en $1/r^{12}$ (positif) traduit une force répulsive entre deux atomes, soit le recouvrement des nuages électroniques à courte distance. Le second terme en $1/r^6$ (négatif) correspond à l'attraction à longue distance. Comme le montre la Figure 5, l'énergie de van der Waals tend vers l'infini quand la distance interatomique (r_{ij}) tend vers zéro. Quand r_{ij} augmente l'énergie va tendre vers zéro.

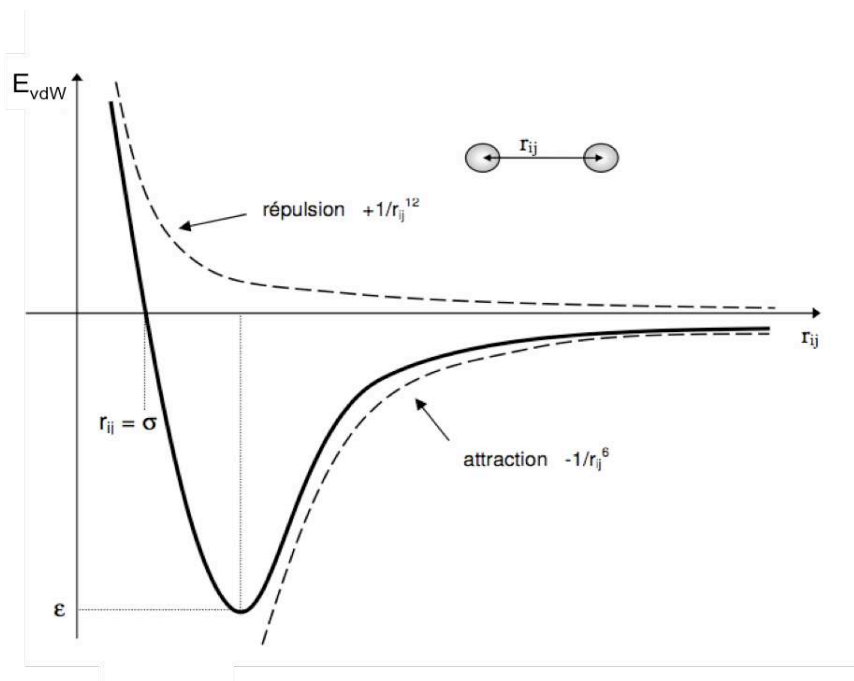


Figure 5. Représentation de la courbe d'énergie de van der Waals sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones.

2.1.4.2. Energie électrostatique

Les interactions coulombiennes entre atomes de charges identiques ou opposées sont représentées à travers le terme d'énergie électrostatique par l'équation suivante :

$$E_{elec} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (8)$$

avec q_i et q_j les charges partielles portées par les atomes i et j , ϵ la constante diélectrique du milieu et r_{ij} la distance entre les atomes i et j .

Les interactions électrostatiques s'appuient sur des distributions électroniques. En mécanique quantique ces charges peuvent être déterminées de manière exacte. Cette détermination de charge n'est envisageable que pour des systèmes simples de l'ordre d'une centaine d'atomes lourds. En mécanique moléculaire la distribution des électrons est considérée comme implicite et est représentée par des charges atomiques partielles. Le moment dipolaire ou le potentiel électrostatique calculés en mécanique quantique sont couramment utilisés pour ajuster de façon optimale la distribution des charges.

2.2. Minimisation d'énergie

Un des intérêts majeurs de la mécanique moléculaire est la recherche de la structure de plus basse énergie afin de déterminer la conformation la plus stable. En effet, les états

stables d'une molécule ou d'un complexe moléculaire correspondent aux minima locaux et globaux. Autrement dit, la probabilité d'existence des différents conformères d'une même molécule est directement reliée à son énergie et donc à ses propriétés. L'espace conformationnel d'une molécule va dépendre du nombre de degrés de liberté et permet de définir un espace à $3N-6$ dimensions (en coordonnées internes), avec N le nombre d'atomes, que l'on appelle plus communément surface d'énergie potentielle. La Figure 6 représente schématiquement le principe de minimisation d'énergie pour un espace à une dimension. A 2 dimensions, la courbe devient une surface et au delà on parle d'hypersurface d'énergie potentielle. La complexité du processus de minimisation et la forme de ce potentiel dépendent du nombre de dimensions considérées. En effet, la fonction d'énergie totale présente pour une molécule ou un système de nombreux minima et maxima (locaux ou globaux). La découverte d'un minimum absolu n'est pas possible en l'état de développement des différents algorithmes dans des temps de calculs raisonnables. L'objectif de la minimisation est de trouver les minima locaux qui s'approchent le plus possible du minimum global.

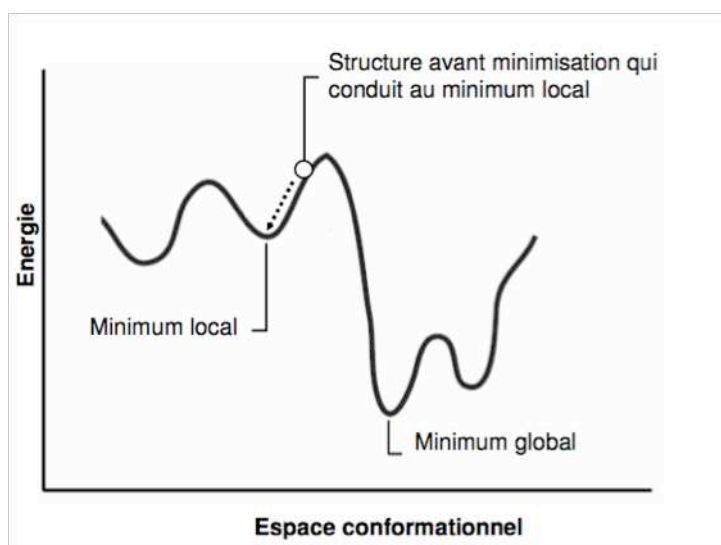


Figure 6. Représentation de la courbe d'énergie d'un espace conformationnel à une dimension.

Malgré des avantages et des inconvénients pour chaque méthode de minimisation, la façon de procéder est en général la même. Le départ se fait d'un point de la surface d'énergie pour descendre jusqu'à rencontrer un minimum local où le gradient d'énergie est égal à zéro. On peut diviser les différentes méthodes selon qu'elles utilisent uniquement la pente de la surface d'énergie potentielle (dérivée première) ou aussi sa courbure (dérivée première et seconde). Nous n'évoquerons ici que les méthodes de la dérivée première utilisées par la suite dans les travaux de modélisation : méthode de la

plus grande pente et du gradient conjugué (pour une revue approfondie sur les différentes méthodes d'optimisation voir Jensen, 2006). Ces méthodes sont particulièrement efficaces pour s'approcher rapidement d'un minimum local surtout lorsque la pente est forte, c'est à dire lorsqu'on est éloigné du minimum.

2.2.1. Algorithme de la plus grande pente

La méthode de la plus grande pente (ou Steepest descent, SD) utilise la dérivée première de la fonction d'énergie. Elle consiste en plusieurs étapes :

- calcul de l'énergie pour une conformation initiale
- déplacement des atomes selon trois coordonnées
- recalcul de l'énergie après déplacement et calcul de la dérivée première de l'énergie (gradient)
- nouveau déplacement des atomes en fonction du gradient et ainsi de suite ...

Comme le montre la Figure 7, le principe de cette méthode est de définir un pas qui servira à incrémenter une variable - par exemple 0,1 pour faire varier la distance de 0,1 Å - et de définir une condition d'arrêt. Le tracé de minimisation obtenue ressemble en définitive à un zig-zag où la direction du gradient suivant est orthogonale à la précédente. Concrètement, la méthode SD est très performante pour minimiser l'énergie des structures éloignées du minimum local situées dans un puits de potentiel étroit (pente élevée) ou pour « relaxer » les structures des contraintes stériques. Elle est beaucoup moins efficace par contre lorsqu'on s'approche du minimum local. Cet inconvénient majeur de la méthode SD s'explique par la direction orthogonale du gradient prise successivement d'un pas à l'autre.

La méthode SD utilisée en première intention est suivie dans les étapes de préparation de la simulation en dynamique moléculaire (DM) par une méthode plus performante comme le gradient conjugué qui permet de s'approcher du minimum local. Cette méthode est particulièrement efficace pour s'approcher rapidement du minimum local surtout lorsque la pente est forte, c'est à dire quand on est loin du minimum.

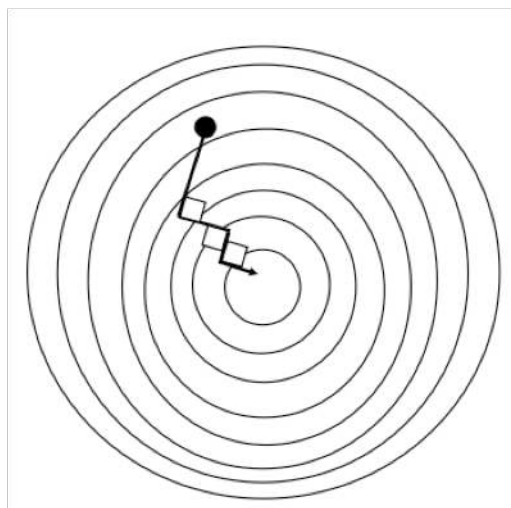


Figure 7. Schématisation d'une minimisation par la méthode de la plus grande pente dans un espace 3D.

2.2.2. Algorithme du gradient conjugué

La méthode du gradient conjugué utilise la dérivée première de l'énergie. A l'opposé de la méthode précédente, l'algorithme utilisé dans la méthode du gradient conjugué prend en compte le gradient du pas précédent sans faire intervenir de déplacement de coordonnées (Figure 8). Une des contreparties de l'efficacité de cette méthode est le surcoût en temps de calcul qui permet tout de même de s'affranchir des oscillations autour du minimum local de la méthode SD.

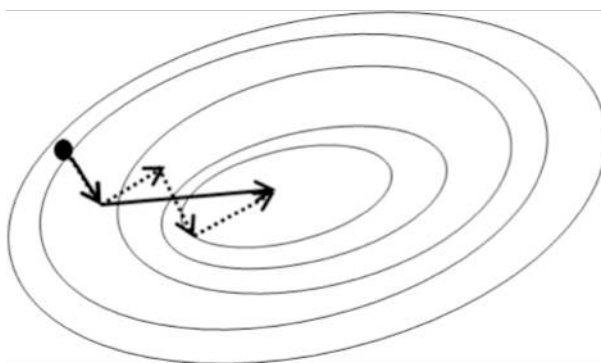


Figure 8. Comparaison entre deux méthodes de minimisation : méthode SD (pointillés) et du gradient conjugué (trait plein).

Les méthodes décrites jusqu'à maintenant n'explorent qu'une partie infime de l'espace conformationnel. La dynamique moléculaire et d'autres techniques plus sophistiquées permettent d'explorer un espace conformationnel bien plus large.

3. Dynamique moléculaire

3.1. Généralités

Alors que la mécanique moléculaire a pour objet d'étude une structure figée, la dynamique moléculaire (DM) va étudier l'évolution du système en fonction du temps en simulant les mouvement intra- et inter-moléculaires. La DM reste moins tributaire des problèmes posés par le choix de la conformation initiale que d'autres méthodes de modélisation.

Cette méthode est tout particulièrement adaptée à l'étude et à la compréhension des phénomènes biologiques qui sont par essence dynamiques. L'étude de la liaison d'un ligand à son récepteur ou l'effet du solvant sur les différentes conformations d'une protéine font partie des sujets passionnants abordés en DM. Les études s'orientent de plus en plus vers la compréhension des mécanismes biologiques complexes suite aux longs développements théoriques réalisés sur des systèmes simples (petite molécule, absence de solvant explicite, etc...). En plus des informations précieuses fournies par les résultats de dynamique sur les phénomènes biologiques, il est possible de calculer des observables physiques (spectre IR et RMN, etc...) avec les contraintes propres aux systèmes biologiques (température, pression, volume). Les phénomènes dynamiques des protéines se déroulent sur des intervalles de temps très larges, de la femtoseconde à plusieurs heures. Ainsi, il convient d'adapter le choix de la méthode de DM au phénomène étudié (Tableau 1). De nombreuses techniques ont ainsi été développées pour couvrir le large spectre des mouvements possibles (pour une revue exhaustive voir Adcock *et al.*, 2006).

La dynamique moléculaire doit rester un outil parmi d'autres pour expliquer et proposer des mécanismes qui devront nécessairement être confirmés expérimentalement. En effet la simulation de modèles macromoléculaires sur des ordinateurs modernes s'appuie sur l'utilisation d'approximations. La méthode la plus rigoureuse serait l'utilisation du formalisme de la mécanique quantique pour déterminer de façon exacte l'interaction entre les différents atomes d'un système. C'est la seule méthode, à l'heure actuelle, incluant de manière implicite le nuage électronique dans sa description des interactions moléculaires. Elle permet donc de simuler la réaction chimique (cassure/formation des liaisons) et les propriétés physico-chimiques confirmées expérimentalement au dépens de temps de calculs extrêmement longs.

Tableau 1 Méthodes utilisées en modélisation pour l'étude des mouvements protéiques

évènement	élongation spatiale (nm)	amplitude (nm)	temps (s)	choix de la méthode
vibration de liaison	0,2-0,5	0,001-0,01	10^{-14} - 10^{-13}	Mécanique quantique
vibration élastique de domaine globulaire	1-2	0,005-0,05	10^{-12} - 10^{-11}	DM classique
rotation de chaînes latérales en surface	0,5-1	0,5-1	10^{-11} - 10^{-10}	DM classique
rotation de chaînes latérales en profondeur	0,5-1	0,05	10^{-11} - 10^{-9}	DM classique
mouvements charnières (domaines globulaires)	1-2	0,1-0,5	10^{-11} - 10^{-7}	Dynamique de langevin, DM avec échantillonnage étendu
transition allostérique	0,5-4	0,1-0,5	10^{-5} -1	DM avec échantillonnage étendu
mouvement de boucle	1-5	1-5	10^{-9} - 10^{-5}	Dynamique brownienne
transition hélice/boucle		> 5	10^{-7} - 10^{-4}	DM avec échantillonnage étendu
association protéique	>> 1			Dynamique brownienne

Son domaine d'application (< 100 atomes) reste malheureusement loin des problématiques biologiques (plusieurs dizaines voire centaines de milliers d'atomes).

La simulation en DM nécessite au départ une structure 3D obtenue par RMN ou R-X. Dans le cas contraire, il faudra faire appel à la modélisation par homologie (cf. 5. Modélisation par homologie). Proche du formalisme de mécanique classique, les atomes sont considérés comme des sphères dures reliés entre elles par des liaisons assimilées à des ressorts. L'effet des électrons est décrit de façon indirecte à travers des potentiels d'interaction empiriques contenus dans les champs de force (cf. 2.1 Le champ de force). La qualité de la simulation va donc dépendre du choix du champ de force qui représente l'énergie potentielle du système. L'évolution des positions atomiques est décrite par les équations de la mécanique classique de Newton pour chaque atome i :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \quad (9)$$

avec F_i la force s'exerçant sur l'atome i de masse m_i , a_i son accélération. L'accélération agissant sur chaque atome dépend de sa masse et de la force qu'il va subir. Or la force de l'équation précédente est le gradient de l'énergie potentielle de l'atome i :

$$\vec{F}_i = -\overrightarrow{\text{grad}}_i E_i(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_i, \dots, \vec{r}_n) \quad (10)$$

En connaissant l'énergie, on peut calculer la vitesse et donc la position de chaque atome. Le calcul de la trajectoire va se faire en intégrant numériquement les N équations à résoudre pour les N atomes du système à étudier. L'algorithme d'intégration, choisi parmi les nombreux qui existent (velocity verlet, leapfrog, etc...), recalcule à chaque incrément de temps δt les nouvelles positions et vitesses à partir des précédentes. Les détails analytiques ne seront pas abordés ici (pour une description plus exhaustive des différents algorithmes voir Adcock *et al.*, 2006). On obtient donc une succession de clichés instantanés du système. Pour obtenir des calculs stables, la valeur du pas d'intégration doit être extrêmement faible ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) de manière à prendre en compte les vibrations atomiques les plus rapides (ex : liaison C-H).

C'est ce qui explique pourquoi les simulations en biologie dépassent rarement les 10 à 100 ns sans l'aide de supercalculateurs. La DM est tributaire de la qualité des structures expérimentales, structures qui représentent un ensemble de conformères responsables de l'activité biologique de la protéine étudiée.

Sans rentrer ici dans les détails de physique statistique, les calculs de DM se font sous l'hypothèse ergodique : la moyenne d'une quantité sur un ensemble de particules équivalentes est égale à la moyenne sur le temps d'une particule. C'est cette hypothèse de physique statistique qui permet à la DM, comme nous l'avons déjà évoqué, de calculer des propriétés physiques à partir d'une simulation de DM. La simulation de DM permet l'obtention d'informations sur la dynamique d'une macromolécule sans explorer l'ensemble de la surface d'énergie potentielle.

3.2. Les ensembles thermodynamiques

Différents systèmes (ou ensembles) thermodynamiques sont utilisés avec certaines observables qui resteront fixes au cours de la simulation de DM. Le choix de l'ensemble dépend des conditions initiales que l'on veut imposer au système étudié. Les systèmes les plus simples sont menés dans l'ensemble N,V,E avec le nombre d'atomes N , le Volume V , et l'Energie E qui sont constants ; on parle dans ce cas d'ensemble microcanonique. D'autres systèmes plus adaptés à l'étude de phénomènes biologiques existent : température constante et énergie variable (ensemble NVT ou ensemble canonique), ensemble pression et température constantes (ensemble NPT). Les ensembles NVT et NPT sont de loin les plus utilisés pour modéliser des systèmes

biologiques : les protéines globulaires, l'ADN, des complexes biologiques, voir des membranes biologiques (pour revue voir Adcock *et al.*, 2006). En effet le paramètre de pression est primordial pour la simulation de protéines enchâssées dans une bicouche lipidique (voir modèle 3D du récepteur 5-HT_{2B}, chapitre III).

3.3. La solvation de la protéine

L'étude de l'effet du solvant et sa répartition autour des protéines est particulièrement importante lorsque que l'on s'intéresse à des protéines qui sont par nature actives en solution. L'amélioration de la compréhension des interactions entre l'eau et les protéines est primordial. Ces interactions mettent en jeu par exemple les liaisons hydrogènes qui jouent un rôle essentiel dans l'activité biologique. L'absence dans le champ de force d'un potentiel dédié spécifiquement à la description de cette interaction, pourtant si importante, est une des limites actuelles à la description des phénomènes de solvation. Les premières tentatives de description des effets du solvant sur la dynamique des protéines n'incluaient le solvant que par des modèles implicites où l'interaction solvant/protéine est évaluée par une constante diélectrique globale. Des modèles plus complexes, intermédiaires avec les modèles explicites existent mais ils ne seront pas abordés ici. La représentation explicite des molécules d'eau entraîne évidemment un surcoût en temps de calcul mais qui est tout à fait abordable pour des systèmes de taille moyenne (50 000 à 100 000 atomes environ). Les modèles explicites sont classés selon le nombre de sites, la rigidité ou la flexibilité des molécules d'eau, la prise en charge des effets de polarisation. Les modèles les plus utilisés comportent trois sites définis par les deux atomes d'hydrogènes et l'atome d'oxygène (SPC, TIP3, TIP3P, etc...) mais aucun ne rend compte de manière optimale des propriétés thermodynamiques, diélectriques et physiques de l'eau pure, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients. Les différences vont porter sur la longueur de liaison O-H, l'angle de valence HOH, les charges atomiques partielles ou sur la nature du potentiel coulombien. Pour notre part, nous avons choisi le modèle TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983), qui est le plus utilisé pour modéliser la solvation de la protéine, et est implémenté directement dans les programmes que nous avons utilisés. Dans ce modèle les molécules d'eau sont considérées comme rigides et constituées de trois atomes (un oxygène et

deux hydrogènes). Leur rigidité est assurée par la présence d'une troisième pseudo liaison entre les deux atomes d'hydrogène.

La taille de la boîte d'eau nécessaire à la solvation de l'ATP7B a été construite en ajoutant une couche de solvation de 12 Å autour de la protéine (voir Chapitre II). En effet, les molécules d'eau se comportent différemment selon leur distance par rapport à la protéine en tenant compte de la valeur seuil (cf. 3.5.1 Méthode de la valeur seuil). Une distance de 12 Å paraît suffisante pour modéliser correctement les différentes sphères d'hydratation (Schröder *et al.*, 2006).

3.4. Traitement des conditions périodiques

L'utilisation de solvant explicite nécessite l'application de conditions périodiques aux limites du système pour obtenir une représentation satisfaisante au niveau macroscopique. La simulation dans le vide n'est pas soumise à ce problème, la molécule étant considérée isolément lors de la simulation. En l'absence de conditions périodico-limites dans un système en solvation explicite, l'ajout du solvant va « repousser » le vide au bord de la boîte d'eau, entraînant ainsi des artefacts dans la simulation. Ce sont les effets de bord. Les molécules proches du vide ne vont pas se déplacer de la même façon que celles entourées par plusieurs couches de solvation. Les conditions périodiques aux limites ont pour but de pallier à ces éventuels artefacts à l'aide d'un système qui devient infini grâce à la construction de 26 répliques orientées dans les 3 directions de l'espace à partir d'une boîte primaire. Ainsi, pendant la dynamique, lorsqu'une particule ou un atome traverse une des faces de la boîte primaire, il/elle réapparaît sur la face opposée (Figure 9), l'atome ou la particule *i* pouvant interagir avec l'image la plus proche d'une particule *j* sans toutefois pouvoir interagir avec elle-même. Le système garde ainsi le nombre de molécules constant. Cette méthode, qui prolonge artificiellement les limites du système étudié, doit s'accompagner d'un choix judicieux de la méthode de calcul des interactions non liantes .

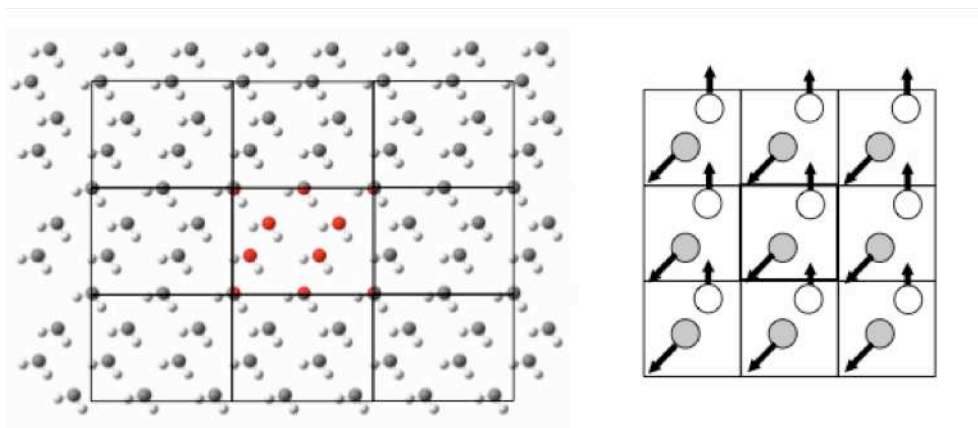


Figure 9. Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques limites et détail sur les mouvements de particules. A droite de la figure est montré le cas d'une molécule (sphère blanche) qui sort d'une unité périodique pour entrer dans l'unité mitoyenne.

3.5. Calcul des interactions non liantes

Les différents termes énergétiques vus précédemment se divisent en deux contributions, liantes (liaison, flexion, torsion) et non liantes (électrostatique et van der Waals). Le calcul des termes liants dépend directement du nombre de liaisons présentes dans la molécule. A l'opposé, le calcul des interactions non liantes est plus délicat. Une distinction en deux catégories est nécessaire pour le calcul bien que ce soient les mêmes équations qui régissent les termes suivants :

- interaction dite « 1-4 » pour les atomes séparés par trois liaisons covalentes successives (seuls les atomes 1-4 interagissent)
- les interactions pour les atomes séparés par plus de trois liaisons.

Cette séparation s'explique par le fait que pour le calcul énergétique du terme de torsion (terme liant) l'identification des atomes séparés par 3 liaisons covalentes est nécessaire. Le calcul des interactions 1-4 non liantes sera fait simultanément. Ceci permet le calcul des interactions 1-4 non liantes en même temps.

Pour le calcul des autres interactions non liantes, le nombre d'interactions va croître rapidement avec le nombre d'atomes. En fait le terme non liant va dépendre du carré de nombre d'atomes alors que le terme liant croît de manière proportionnelle. Pour les systèmes biologiques, où la taille du système peut dépasser la centaine de milliers d'atomes, le calcul devient très vite prohibitif. Deux méthodes complémentaires ont été développées pour traiter cette interaction : la méthode de la valeur seuil et la sommation d'Ewald.

3.5.1. Méthode de la valeur seuil

Une des méthodes simples pour limiter le temps de calcul est de prendre en compte seulement les atomes situés à une distance inférieure à une valeur seuil (ou *cut-off*). Au delà les contributions non liantes sont considérées comme nulles. Cette méthode a été longtemps critiquée par le passé car elle introduit des discontinuités importantes dans le calcul du potentiel, générant des forces importantes à proximité du *cut-off*.

Pour pallier à cet inconvénient majeur, il a été développé des fonctions de lissage (*potential switch*, *potential shift*) qui, utilisées dans un ordre précis, permettent d'obtenir des résultats probants : ces fonctions peuvent être utilisées pour l'énergie de van der Waals comme pour les interactions électrostatiques. Comme le montre la Figure 10 pour l'énergie de van der Waals, ces fonctions vont atténuer les discontinuités pour des distances inférieures au *cut-off*. Pour cette méthode, le choix du *cut-off* est primordial. Il doit être inférieur à la moitié de la longueur de la boîte primaire pour éviter les interactions entre la protéine et ses images. Une valeur trop grande est également déconseillée car elle entraîne des artefacts dans la structure de la boîte d'eau (Yonetani, 2005). D'autres méthodes plus complexes ont été développées à partir de la sommation d'Ewald.

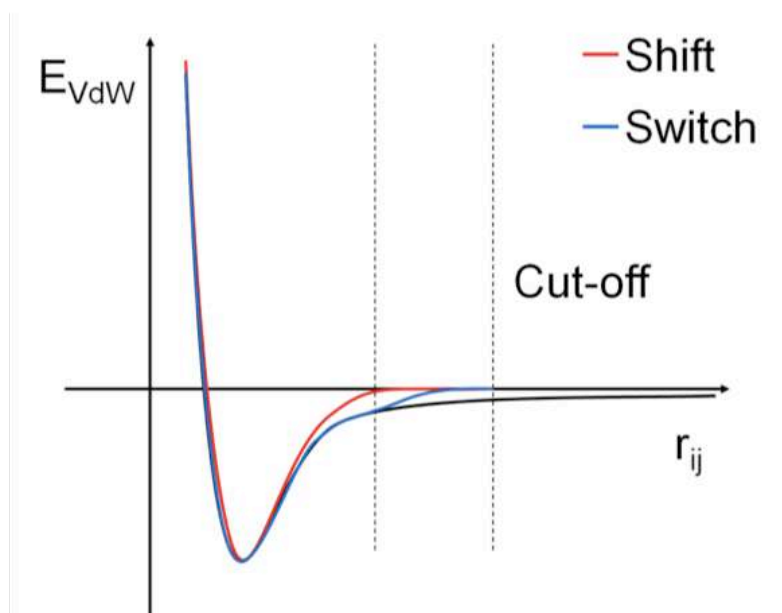


Figure 10. Représentation de l'énergie de van der Waals selon différentes méthodes de lissage: absence (noir), *potential shift* (rouge) et *potential switch* (bleu).

3.5.2. La sommation d'Ewald

Ce qui pouvait être utilisé pour les interactions de van der Waals qui convergent rapidement ne peut être utilisé pour les interactions électrostatiques. En effet, l'énergie de van der Waals varie en $1/r^6$ et en $1/r^{12}$ tandis que l'électrostatique varie en $1/r$ (Equations 7 et 8). A l'origine développée pour des études sur des cristaux ioniques, la méthode d'Ewald s'est peu à peu imposée dans le domaine des protéines pour le traitement de l'énergie électrostatique en conditions périodiques.

Elle utilise deux fonctions mathématiques que nous ne détaillerons pas ici. La première est réelle, appliquée à courte distance, et la seconde fonction est complexe, appliquée à longue distance, pour faire converger rapidement la somme des interactions électrostatiques afin de diminuer les temps de calculs. Physiquement cela revient à considérer que chaque charge est entourée par une distribution de charge neutralisante d'intensité égale, mais de signe opposé pour obtenir une convergence rapide à courte distribution en écrantant les charges. A ceci vient s'ajouter une distribution de charge qui annule la précédente afin que le potentiel global soit identique à l'original. Cette méthode a toutefois quelques inconvénients. Elle impose de travailler sur un système périodique et électriquement neutre. Ce dernier élément est moins problématique pour les systèmes biologiques, le simple ajout de contre-ions permettant d'obtenir un système neutre.

3.5.3. Particule Mesh Ewald

D'autres méthodes ont été développées par la suite à partir de la sommation d'Ewald telle que la méthode de Particule Mesh Ewald (PME) qui est une des plus utilisées (pour revue voir Sagui *et al.*, 1999).

Cette méthode est une variante de la méthode de sommation d'Ewald dont le calcul est plus rapide : le calcul n'est plus réalisé sur toutes les charges partielles comme dans la sommation d'Ewald mais à partir d'un maillage régulier de charges, les points de la grille étant repositionnés sur la grille à l'aide d'une transformée de Fourier (Figure 11). Cette grille va subir elle-même une transformée de Fourier afin d'obtenir l'énergie de chaque point. Enfin, après transformation inverse, le potentiel permet d'obtenir la force appliquée sur chaque atome pour en déduire *in fine* les nouvelles coordonnées.

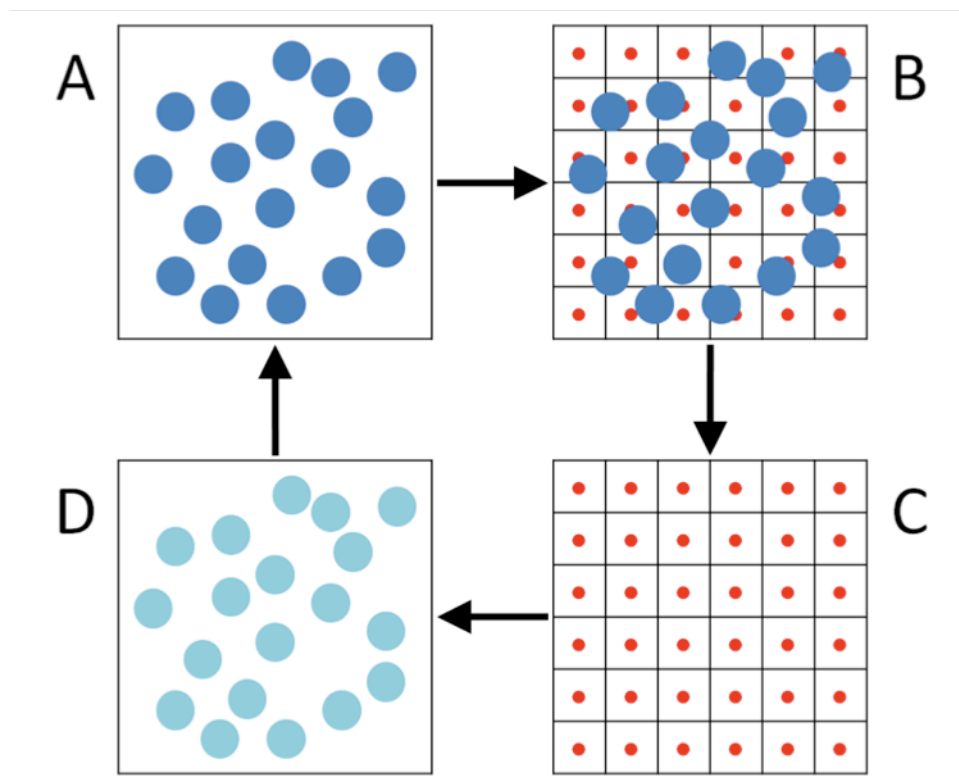


Figure 11. Représentation des différentes étapes pour le calcul des interactions électrostatiques par la méthode PME. (A) Répartition des charges au sein du système sous forme de sphères bleues. (B) Découpage du système selon un maillage régulier dans lequel les charges partielles sont interpolées. La taille de la grille correspond à celle de la boîte périodique. (C) Calcul des énergies et des forces à l'aide d'une transformée de Fourier en chaque point de la grille, les charges partielles interpolées étant représentées par des points rouges. (D) Application des forces sur les atomes et mise à jour des coordonnées.

3.6. Analyses usuelles en dynamique moléculaire

En plus du suivi de l'énergie cinétique et potentielle du système, différents outils sont disponibles pour analyser les résultats obtenus au cours de la simulation de DM pour savoir si le système est stabilisé, pour évaluer la pertinence de certains mouvements protéiques ou pour analyser l'existence et juger la pertinence de telle ou telle interaction. On peut utiliser des paramètres globaux ou locaux.

3.6.1. Ecart quadratique moyen (RMSD)

L'écart quadratique moyen (ou RMSD) est employé pour quantifier la modification moyenne que va subir la protéine au cours de la simulation. Il est calculé grâce à l'équation suivante :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} \delta_i^2} \quad (11)$$

Avec δ_i la distance entre les N paires d'atomes équivalents que l'on veut comparer. Le RMSD est utilisé pour comparer la structure des protéines. Plus il est proche de 0, plus la structure d'intérêt est semblable à la structure de référence. Pour suivre l'évolution de la protéine à chaque pas de temps, le choix de la structure peut être celle du pas précédent, ou celle en fin de minimisation. La mesure n'est réalisée que sur la chaîne peptidique principale des protéines ou simplement sur les carbones alpha (C_α) pour obtenir une vue d'ensemble du mouvement protéique. La valeur du RMSD augmente progressivement au cours de la production pour arriver à un plateau ; on considère alors que le système est stabilisé. A partir de ce moment, il est possible de réaliser les autres analyses sur la partie de la trajectoire pour laquelle le RMSD s'est stabilisé.

3.6.2. Rayon de giration

Un autre critère qui peut être utilisé pour témoigner d'une stabilisation globale au cours d'une trajectoire est le rayon de giration (R_g). Il permet de donner une idée sur l'extension spatiale de la structure à partir de son centre de masse. Une élévation substantielle ($> 5 \text{ \AA}$ par exemple) en cours de simulation peut signifier un dépliement de la protéine, une désorganisation des structures secondaires. Il peut être utilisé pour suivre la dénaturation au cours d'un processus de chauffage à haute température.

La formule du R_g est la suivante :

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|\vec{r}_i - \vec{r}_{cm}\|^2} \quad (12)$$

Avec N le nombre total d'atomes, r_i la position de l'atome i et r_{cm} la position du centre de masse de la protéine.

3.6.3. Fluctuations atomiques (RMSF)

Alors que le RMSD concerne l'évolution de l'écart des distances atomiques au cours du temps par rapport à une structure de référence, le RMSF (ou fluctuations atomiques) représente la moyenne de la déviation pour chaque résidu (le C_α de chaque résidu) comparativement aux mêmes atomes de la structure de référence.

Le RMSF est calculé par la formule suivante :

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=0}^{t=T} (x_i^t - \tilde{x}_i)^2} \quad (13)$$

Avec $RMSF_i$, la fluctuation atomique de l'atome i calculée pour une durée de trajectoire de T pas, avec la position de l'atome au temps t et la position moyenne sur le même intervalle. A travers la relation entre le B factor (ou facteur d'agitation thermique) et le RMSF, il est possible de comparer des données obtenues en DM avec des données expérimentales :

$$B_{factor} = \frac{8\pi^2}{3} RMSF^2 \quad (14)$$

Une valeur nulle pour la fluctuation atomique signifie que la position moyenne du résidu ne diffère pas de celle de la structure de référence. Cette grandeur permet aussi bien de localiser les régions charnières de la protéine que les résidus responsables des mouvements de grande amplitude.

Pour affiner l'étude des mouvements de la protéine, des outils plus complexes existent, pouvant distinguer les mouvements collectifs ou locaux au sein de structures secondaires, entre les différents domaines d'une même protéine comme par exemple l'analyse vibrationnelle (calcul des modes normaux Hinsen, 1998, entropie conformationnelle Andricioaei *et al.*, 2001).

3.6.4. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes sont d'une importance fondamentale en biologie du fait de leur rôle dans le phénomène de solvatation et dans la catalyse enzymatique pour ne citer que deux exemples majeurs. Elles jouent également un rôle structural par la cohésion qu'elles assurent au niveau des structures secondaires. Elles se situent entre les liaisons fortes (covalentes, ioniques) et les liaisons faibles (van der Waals), l'énergie nécessaire pour rompre une liaison variant entre 5 et 30 kJ/mole. Elles se « forment » entre des atomes donneurs (azote, oxygène, fluor, soufre..) et accepteurs de liaisons hydrogènes d'électronégativité différente. Elles sont de nature anisotrope, c'est à dire qu'elles dépendent de contraintes géométriques entre le donneur (D) et l'accepteur (A) qui peuvent être définis (Figure 12) :

- l'angle entre les vecteurs DH et DA doit être inférieur à 30°
- la distance d entre les atomes D et A doit être inférieure à $3,5 \text{ \AA}$

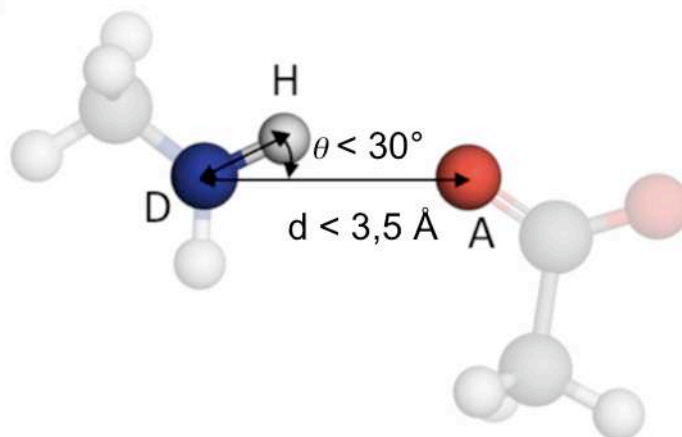


Figure 12. Paramètres géométriques d'une liaison hydrogène avec les paramètres utilisés dans le programme Gromacs. D est l'atome donneur, A est l'atome accepteur et H l'atome d'hydrogène participant à la liaison hydrogène.

4. Amarrage moléculaire

L'amarrage moléculaire peut être utilisé en complément d'une étude de DM comme pour l'élucidation du site de liaison de l'ATP de la protéine ATP7B (voir partie Methods, Article I). Le principe de cette technique est d'obtenir un ensemble d'orientations possibles entre une molécule et une protéine par exemple en évaluant quantitativement les interactions du complexe. L'amarrage moléculaire permet donc d'explorer un ensemble de conformations d'un ou plusieurs ligands dans le site de fixation de la cible afin de classer dans un second temps les ligands selon leur capacité à interagir dans la cavité d'intérêt. Cette technique répond en partie à la problématique évoquée précédemment sur la présence d'un nombre de degrés de liberté exponentiels des systèmes biologiques en augmentant l'exploration de l'espace conformationnel des molécules d'intérêt que l'on nommera par commodité ligand.

Le processus d'échantillonnage, qui est la première étape du protocole d'amarrage moléculaire, peut faire intervenir différentes méthodes (systématique, simulation moléculaire, stochastique) et aboutit à la génération de « poses ». La stabilité du complexe ligand-protéine (ex : récepteur, enzyme, etc...) est évalué par une fonction de score qui est basée sur une approximation de paramètres thermodynamiques.

De nombreux logiciels existent. Nous nous contenterons de décrire le logiciel AutoDock (Morris *et al.*, 2009) utilisé pour ce travail (pour une revue détaillée sur l'amarrage moléculaire voir Morris *et al.*, 2008).

AutoDock impose au système l'exploration de l'espace conformationnel en autorisant certains degrés de libertés au ligand, tout en maintenant fixe le « récepteur ». Il réalise, parmi les différentes méthodes utilisées pour représenter la cible, une grille du récepteur. Une grille est une matrice tridimensionnelle qui englobe l'intégralité ou une région choisie intéressante du récepteur étudié. Chaque point de la grille enregistre le potentiel d'interaction entre une sonde, constituée d'un ou plusieurs atomes, et l'ensemble des atomes du récepteur.

L'énergie calculée par AutoGrid, qui est un programme d'Autodock, en chaque point de la grille, dépend du type atomique, de la charge et de la position de la cible. La représentation du récepteur sous forme de grille permet ainsi un traitement plus rapide pour calculer les contributions énergétiques du complexe. La flexibilité n'est réellement prise en compte que pour le ligand.

Les applications de l'amarrage moléculaire sont nombreuses, notamment en chimie médicinale, dans la conception de nouvelles molécules thérapeutiques (pour une revue détaillée sur le sujet voir Kitchen *et al.*, 2004).

4.1. Méthode de recherche conformationnelle

Les différentes méthodes de recherche conformationnelle peuvent être divisées en plusieurs catégories : systématiques, stochastiques ou simulateurs.

Les méthodes de recherche systématique prennent en compte l'ensemble des degrés de liberté du ligand. Pour éviter des problèmes d'explosion du calcul, le ligand peut être placé par fragments sur le site actif et reconstruit par incrémentation, une minimisation étant opérée à chaque pas (ex : programme DOCK, Morris *et al.*, 2009).

La recherche conformationnelle par des méthodes stochastiques ou aléatoires se fait sur la base d'une modification aléatoire du ligand (longueur de liaison, angle de valence angle dièdre, etc...), chaque nouvelle pose étant évaluée par rapport à une fonction de probabilité prédéfinie (ex : Monte Carlo). Sans fondement physique, ces méthodes ont l'avantage d'explorer l'espace conformationnel en ignorant les barrières d'énergie.

Les méthodes simulatoires reposent sur la dynamique moléculaire et la minimisation d'énergie. La dynamique moléculaire est actuellement la plus courante, malgré le fait qu'elle n'atteigne généralement que des minima locaux. Quant à la minimisation d'énergie, elle est rarement utilisée seule, mais plutôt intégrée en complément des techniques précédemment citées.

Plusieurs méthodes de recherche conformationnelle ont été implémentées dans le logiciel AutoDock :

- le recuit simulé de type Monte Carlo (Metropolis *et al.*, 1953) fut la première. A chaque étape les variables du ligand définissant les degrés de liberté du complexe ligand-protéine (translation, rotation, torsion) sont perturbées de manière aléatoire. Le nouveau complexe va être accepté selon des critères énergétiques prédéfinis. Cette variante de la méthode de Monte Carlo a pour particularité d'avoir le premier cycle simulé à haute température pour ensuite s'abaisser dans les cycles suivants. Elle convient pour les ligands ayant un nombre de degrés de libertés réduit.

- l'algorithme génétique est le plus utilisé. Il reprend des mécanismes et la terminologie de la génétique et de l'évolution. L'organisation d'un ligand en interaction avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les « variables d'état » et chaque variable d'état correspond à un gène. L'ensemble de ces variables définit un génotype, rassemblé au sein d'un chromosome, les coordonnées atomiques codant le phénotype. Différentes opérations telle que des mutations, recombinaisons, migrations vont aboutir à produire de nouveaux gènes. Ils seront ensuite sélectionnés à l'aide de critères énergétiques. Des algorithmes de recherche locale ont été ajoutés à l'algorithme génétique pour aboutir à l'algorithme de Lamarck.

- l'algorithme de Lamarck est une variante de l'algorithme génétique. Cette méthode s'inspire des travaux de Jean-Baptiste Lamarck et de sa théorie sur la transmission des caractéristiques phénotypiques acquises à la descendance, théorie aujourd'hui réfutée. A la différence de l'algorithme génétique classique, la méthode issue de Lamarck inclut une étape de minimisation entre chaque conformation, étape préalable à l'évaluation par la fonction de score. La population suivante est fondée sur certains membres de la population parente dont l'énergie a été minimisée. Cet algorithme est plus rapide que le recuit simulé et l'algorithme génétique standard, il permet l'amarrage de ligands ayant un plus grand nombre de degrés de liberté.

4.2. Fonction de score

Après l'échantillonnage, la seconde étape de l'amarrage moléculaire est de définir une fonction objective pour évaluer l'interaction : la fonction de score. Le score est une donnée numérique qui permet une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à la formation du complexe :

$$\Delta G_{\text{complexe}} = \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}} \quad (15)$$

La fonction de score est une approximation de l'affinité entre la protéine et le ligand, elle se distingue donc de l'activité.

Les fonctions de score qui sont implémentées dans les logiciels d'amarrage moléculaire sont basées sur plusieurs suppositions dans l'évaluation des interactions protéines-ligands qui ne permettent pas de restituer l'intégralité des phénomènes physiques mis en jeu (ex : effets entropiques). Elles se divisent en trois catégories : champs de force, fonction empirique tentant de reproduire des données expérimentales (énergie de liaisons, etc...) ou des fonctions dérivées d'informations descriptives, comme les données statistiques obtenues par l'analyse expérimentale des fréquences d'interaction entre atomes au sein de complexes protéine ligand.

Dans le cas d'AutoDock, le calcul de l'énergie libre est réalisée par la fonction de score suivante :

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon_{r_{ij}} r_{ij}} \right) + \Delta G_{hbond} E(\theta) \sum_{i,j} \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)} \end{aligned} \quad (16)$$

Chaque terme ΔG (ex : ΔG_{vdW} , ΔG_{elec} , etc...) à droite de l'égalité est un coefficient déterminé par régression linéaire à partir de données de complexes ligand protéine obtenus expérimentalement. Les sommes sont réalisées sur les paires d'atomes i (ligand) et j (protéine). Les contributions énergétiques dans le vide sont incluses pour les deux termes d'énergie de van der Waals et d'énergie électrostatique ainsi que celui de liaison hydrogène. Dans le troisième terme de l'équation qui est le terme de la liaison

hydrogène, $E(\theta)$ ajoute un terme de dépendance angulaire avec θ l'angle entre l'atome donneur et l'atome accepteur (cf. Figure 12)

Le quatrième terme qui est le terme de torsion prend en compte la diminution d'entropie lorsque le ligand se fixe sur sa cible. Le dernier terme permet d'inclure une contribution énergétique du phénomène de solvation/désolvation qui a lieu lors de la liaison du ligand. Ainsi, le programme Autodock permet de calculer une valeur approchée de l'enthalpie libre de complexation dans le vide mais permet aussi d'obtenir une estimation des variations d'enthalpie libre des espèces isolées et du complexe lors de la complexation en solution.

5. Modélisation par homologie

L'étude en modélisation moléculaire des protéines nécessite des données structurales de qualité. Dans le cas où la structure de la protéine d'intérêt n'est pas disponible, est incomplète ou n'est pas l'isoforme désirée, dans les bases structurales telle que la PDB (Protein Data Bank), il est possible d'utiliser la modélisation par homologie. Ceci afin d'obtenir une structure 3D de la protéine d'intérêt à partir d'une protéine de séquence homologue ou de la même famille.

5.1. Principe

La modélisation par homologie est une technique de modélisation comparative. Elle part de l'hypothèse que des protéines qui ont des séquences homologues ont des structures proches (Chothia *et al.*, 1986). Pour ce faire il est nécessaire de disposer de la séquence de la protéine d'intérêt et de la structure 3D d'une protéine « patron » (ou template). A ceci s'ajoute d'autres informations qui vont améliorer la qualité de la prédiction de structure telles que les structures secondaires, les contraintes géométriques, les données expérimentales. Que ce soit par l'utilisation d'algorithmes manuels ou par l'utilisation de logiciels prêts à l'emploi comme Modeller (Fiser *et al.*, 2003), la procédure est la même. La première étape est l'alignement des séquences protéiques « proches » afin d'évaluer le pourcentage d'homologie et d'identifier les zones où les séquences sont très conservées. C'est le cas par exemple pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui ont une organisation structurale commune avec des régions conservées au sein de ses hélices transmembranaires. La modélisation dans ce cas est

relativement complexe, dans la mesure où ces récepteurs existent sous différentes conformations (inactive, active, etc...) sans patron moléculaire disponible pour chacune d'elles (pour une revue sur la modélisation par homologie des RCPG voir Patty *et al.*, 2006).

Dans les cas où l'homologie de séquence est faible (< 30 %), des alignements multiples peuvent ainsi être réalisés, la présence de plusieurs structures 3D permettant de pallier le peu de recouvrement obtenu lors de l'alignement.

Très efficace pour la prédiction de structure avec une homologie de séquence, le mode opératoire se complique si la protéine d'intérêt n'a pas de patron moléculaire pour les régions flexibles ou non structurées (séquences extracellulaires des RCPG, boucles..). Ce fut le cas par exemple pour la modélisation de la partie N-terminale du récepteur à la sérotonine 5-HT_{2B} (cf. III- Etude du récepteur humain 5-HT_{2B}). D'autres méthodes comme celles basées sur des statistiques de repliements de séquences peptidiques telle que Rosetta (Rohl *et al.*, 2004) peuvent également être utilisées.

6. Conclusion

La dynamique moléculaire est une méthode robuste et efficace pour étudier des phénomènes biologiques à l'échelle atomique. Son utilisation dans des fenêtres de temps suffisantes - plusieurs dizaines de nanosecondes - pour obtenir des données informatives se restreint à l'étude de systèmes solvatés le plus souvent monomériques, les complexes multimériques et les systèmes membranaires composés de plusieurs centaines de milliers d'atomes restant hors d'atteinte. L'essor des supercalculateurs d'accessibilité croissante a pourtant permis de progresser. Comme pour tout outil, il faut connaître les limites de la DM pour l'utiliser dans des conditions optimales. La paramétrisation des champs de force nécessite l'utilisation de constantes mesurées empiriquement qui peuvent varier d'un programme à l'autre. Les équations mises en jeu à travers la somme de diverses contributions énergétiques ne sont pas toujours à même de rendre compte des phénomènes mis à jeu.

Les charges partielles, fixes, qui sont attribuées à chaque atome, l'absence de contribution énergétique propre pour les liaisons hydrogènes font partie de ces limites. Les champs de force polarisables développés restent encore du domaine de la recherche.

De plus, l'impossibilité de rompre ou de créer des liaisons en DM réduit le champ d'application de cette méthode, l'étude de systèmes réactionnels comme les réactions enzymatiques pouvant être difficilement simulés sans l'utilisation de méthodes mixtes (DM et chimie quantique).

En outre, l'exploration de l'espace conformationnel avec les champs de forces classiques est limitée. De nature harmonique, ils empêchent le franchissement de barrières énergétiques, restreignant l'évolution des molécules dans les puits de potentiels. Des techniques plus sophistiquées comme le recuit simulé ont été mises au point pour pallier à cet inconvénient. La REMD (ou *Replica Exchange Molecular Dynamics*) profitant de l'essor des multiprocesseurs permet de réaliser des simulations simultanément à des températures croissantes (García *et al.*, 2001). Une autre méthode récemment mise au point est la métadynamique qui associe au champ de force de DM classique un potentiel énergétique qui pousse le système à évoluer vers des zones inexplorées, facilitant ainsi le franchissement des barrières énergétiques (Laio *et al.*, 2002).

Pour toutes ces raisons, la validation expérimentale des modèles obtenus en DM reste un pré-réquis essentiel à l'interprétation des résultats.

Chapitre II.

Etude du transporteur humain ATP7B

II- Etude du transporteur humain ATP7B

1. Introduction

Ce travail de modélisation sur la protéine ATP7B a pour but de proposer un outil de modélisation permettant d'interpréter les nombreuses mutations qui vont perturber la fonction de ce transporteur d'ions cuivre aboutissant à la maladie de Wilson. En effet le service de biochimie de l'hôpital Lariboisière dans lequel j'ai réalisé mon travail de thèse fait partie du centre de référence national de cette pathologie situé au sein même de l'hôpital.

Grâce aux informations structurales disponibles, nous voulons dans un premier temps construire le modèle 3D du domaine N de la protéine ATP7B. Le site de liaison de l'ATP du domaine N n'est pas clairement défini et la participation du magnésium reste controversé. L'étude de modélisation moléculaire du modèle 3D va permettre de répondre à ces deux questions et de mieux comprendre les mécanismes à l'oeuvre dans la liaison du nucléotide. La construction du modèle 3D et nos prédictions sur le site de liaison de l'ATP au domaine N doivent être validés expérimentalement.

Dans un second temps, le modèle 3D mis au point pourra servir d'aide au diagnostic par la simulation des nombreux mutants présents au niveau du domaine N.

2. Les ATPases de type P

2.1. Généralités

L'ATP7B appartient à la superfamille des ATPases. Ce sont des protéines ubiquitaires dans le règne du vivant (animal, végétal, bactérien) qui se divisent en quatre catégories : P, V, F et les ABC transporteurs. Parmi elles, les ATPases de type P sont des enzymes qui ont pour rôle principal de maintenir le gradient électrochimique membranaire (ou potentiel de membrane). L'existence de concentrations différentes d'ions de part et d'autre d'une membrane au sein des différents compartiments cellulaires, à l'origine de ce gradient, est essentiel à nombres de fonctions biologiques (ex : conduction nerveuse, contraction musculaire). Ce gradient de concentration important ($> 10^{-5} - 10^{-6} \text{ M}$) est obtenu par le transport actif d'espèces ioniques en sens inverse du mouvement naturel

de diffusion. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire au changement conformationnel qui modifie l'affinité du transporteur pour sa cible et permet ainsi le passage transmembranaire de l'ion. Le cycle catalytique comprend plusieurs étapes avec formation d'un intermédiaire phosphorylé, ce qui a valu à ces transporteurs l'appellation de P-ATPases. Leur séquence ayant beaucoup divergé au cours de l'évolution, l'utilisation d'un algorithme d'alignement de séquences protéiques élaboré a été nécessaire pour classer les P-ATPases en 5 types distincts (types I à V, Axelsen *et al.*, 1998). De fait, la plupart des séquences brutes comportent moins de 15 % d'identité stricte, leur taille variant considérablement d'une protéine à l'autre (entre 650 et 2000 acides aminés). Les sous types A, B ou C rendent compte de l'existence, au sein d'une même « classe », d'une spécificité de substrat différente. L'analyse des séquences a également permis d'identifier le motif d'acides aminés (aa) conservés « DKTG » portant l'acide aspartique phosphorylé durant le cycle de transport ionique (cf. 2.2 Cycle réactionnel). Certaines protéines de cette famille ont suscité un engouement scientifique important de par leur importance physiologique et leur impact en thérapeutique, ce qui explique le nombre croissant de structures tridimensionnelles disponibles (pour revue exhaustive Futai *et al.*, 2004). Il est en ainsi pour la pompe Na^+/K^+ (type IIC), qui régule la balance cellulaire Na^+/K^+ des cellules. En effet, la pompe est inhibée avec plus ou moins de spécificité par les digitaliques (Katz *et al.*, 2010) utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Proche d'elle, la pompe H^+/K^+ (IIC) régule le pH des sécrétions acides. Elle est inhibée par l'action de médicaments comme l'oméprazole (Mopral®). La Ca^{2+} -ATPase sarcoplasmique ou SERCA (IIA), est impliquée dans le contrôle de la contraction des muscles squelettiques, la perte de fonction entraînant une myopathie connue sous le nom de maladie de Brody (Pedersen, 2002). Enfin, les P-ATPases à cuivre représentées par l'ATP7B (IB) dont nous allons évoquer l'implication dans la maladie de Wilson (cf. 3.2 Implication dans la maladie de Wilson). Leur organisation structurale canonique est :

1. taille entre 70 et 150 kDa.
2. nombre important de segments transmembranaires organisés en hélices transmembranaires (HTM) formant le domaine Membranaire (M), (> 8).
3. extrémité N- et C-terminales situées dans le cytoplasme.
4. présence de boucles cytoplasmiques contenant les domaines fonctionnels (A, P, N). impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme

Le nombre exact de domaines n'est connu que depuis quelques années. La première structure cristallographique obtenue à haute résolution (2,6 Å) a permis d'identifier les différents domaines présents chez la SERCA et de préciser leurs interactions mutuelles nécessaires à la liaison de l'ion calcium (Toyoshima *et al.*, 2000). La Figure 13 montre l'agencement relatif des différents domaines de ces protéines membranaires. Les domaines N et P, au sein du domaine de liaison à l'ATP (DLA), participent aux étapes de phosphorylation avec liaison de l'ATP, le domaine Adapteur (A), dont le rôle reste encore obscur, participerait aux étapes de déphosphorylation. Le domaine M porte le site de liaison au calcium pour la SERCA. La particularité de l'ATP7B est d'avoir un site ectopique de liaison au cuivre. Les 6 motifs de liaison au métal (MLM), dont le nombre varie dans le sous type IB, sont regroupés au sein du domaine de liaison au métal (DLM) situés au sein d'une insertion cytoplasmique N-terminale.

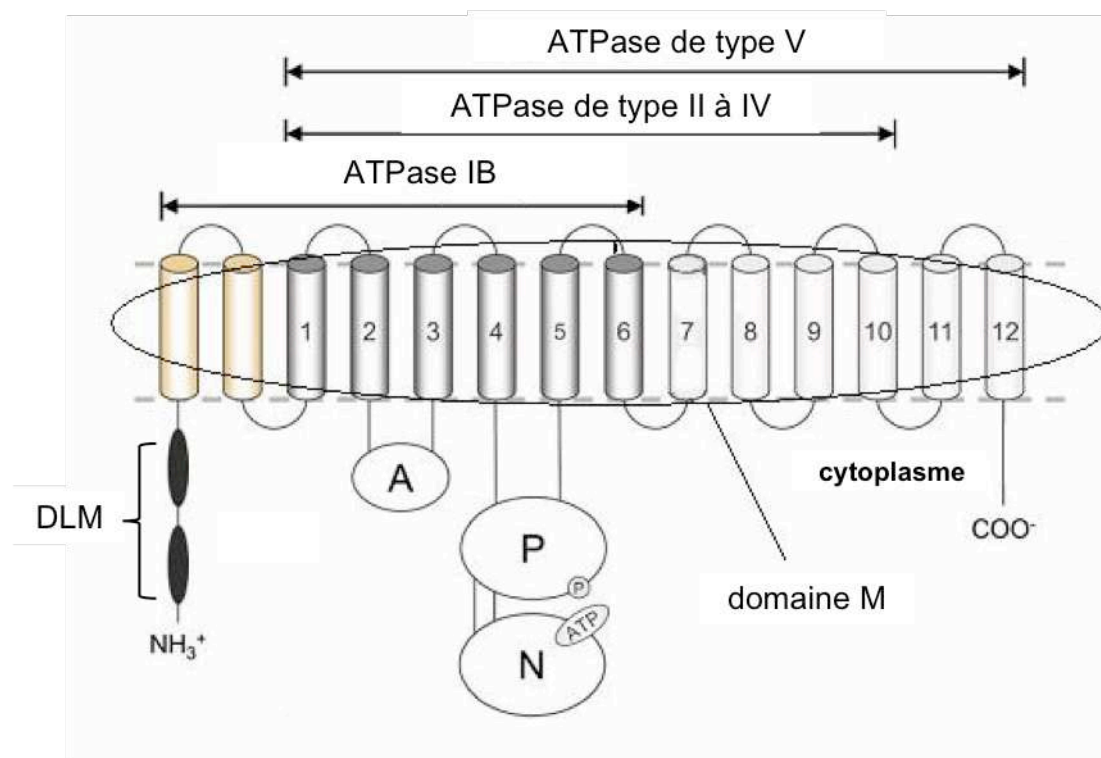


Figure 13. Organisation structurale des P-ATPases (Bramkamp *et al.*, 2007). Les différents types d'ATPases sont représentés schématiquement avec le domaine M, cytoplasmique de taille variable (gris et blanc) ainsi que le domaine adaptateur (A) et les domaines N et P situés dans le cytoplasme. Les ATPases IB possèdent dans la partie N-terminale (en jaune) une extension cytoplasmique qui porte les sites de liaison au métal regroupés dans le domaine de liaison au métal (DLM).

2.2. Cycle réactionnel

Comme évoqué précédemment, les P-ATPases vont utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le passage membranaire de leur substrat. L'étape clé dans le cycle réactionnel est la phosphorylation du domaine P après fixation de l'ATP au domaine N. Le cycle de la SERCA est de loin le mieux connu, grâce à l'équipe de Toyoshima qui continue de publier fréquemment de nouvelles structures cristallographiques d'intermédiaires réactionnels, révélant ainsi le mécanisme d'action complexe de ces protéines (Toyoshima *et al.*, 2004). A ceci s'ajoute l'utilisation d'artefacts nécessaires pour obtenir la cristallisation des protéines (analogue non hydrolysable de l'ATP, inhibiteur stabilisant) qui éloignent les structures obtenues de la conformation réellement présente *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous nous contenterons ici de décrire schématiquement les quatre étapes principales du cycle réactionnel qui a pour but de faire passer un ion « X » dans un sens alors qu'un ion « Y » est transporté en sens inverse (cf. Figure 14). Les quatre étapes qui composent ce cycle font intervenir deux intermédiaires réactionnels (E1 et E2) avec des conformations et des propriétés distinctes vis à vis de l'ion transporté. Le cycle commence par la liaison d'un ion X à l'intermédiaire E1 (E1-X), dit de haute affinité, par un « tunnel » présent dans le domaine M, déplaçant l'équilibre du complexe E1-Y vers la libération d'un ion Y dans le cytoplasme. Après la fixation du complexe Mg^{2+} -ATP, le domaine N va se rapprocher du domaine P pour permettre la phosphorylation de E1 (E1-P) grâce à la présence d'une région charnière flexible qui porte le motif de phosphorylation. En effet, avant la rotation d'environ 20° , l'ATP lié au domaine N se situe à plus de 25 Å de l'acide aspartique (D351) en début de cycle, pour finir à 3 Å de sa cible. Le rapprochement de ces deux domaines, médié par la chaîne phosphate du nucléotide qui établit des liaisons de coordination avec l'ion Mg^{2+} , va permettre l'attaque nucléophile du D351. La phosphorylation va entraîner un réarrangement du domaine P qui va aboutir à la séquestration transmembranaire des ions Ca^{2+} dans le cas de la SERCA avec formation d'un intermédiaire acylphosphate caractéristique de cette famille de protéines. Puis, le domaine A va à son tour pivoter sur lui-même d'environ 90° , mettant ainsi en contact son motif « TGE » avec les résidus du site de phosphorylation situés à l'interface du domaine N et P (MacLennan, 2000). Ce motif riche en résidus polaires viendrait interagir avec l'intermédiaire phosphorylé au niveau de l'acide aspartique D351

favorisant par la suite l'hydrolyse du groupe phosphate par déstabilisation des liaisons de coordination formés avec l'ion Mg^{2+} . Ces mouvements vont entraîner un changement de conformation d'E2-P avec des réarrangements complexes des hélices transmembranaires (HTM) aboutissant à une diminution de l'affinité pour l'ion X. Par la suite la libération de l'ion X dans le milieu extracellulaire va permettre la prise en charge d'un nouveau contre-ion Y. Le mécanisme de cette étape d'hydrolyse est moins connu et ferait intervenir le domaine A ainsi que des molécules d'eau en contact avec le site catalytique de l'intermédiaire E2. Un nouveau cycle peut reprendre avec la prise en charge d'un nouvel ion (E1).

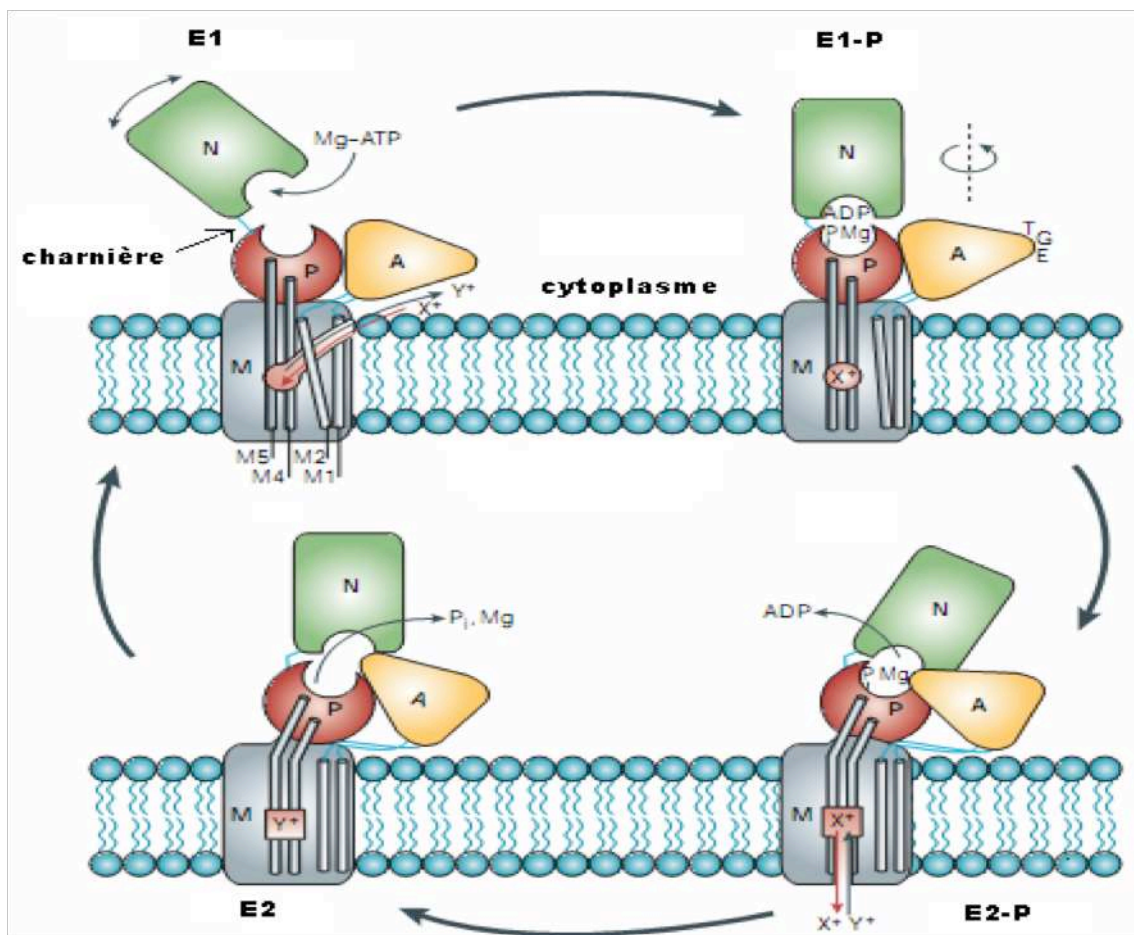


Figure 14. Cycle réactionnel schématique des P-ATPases. La figure présente le cycle enzymatique conduisant au passage d'un ion X en échange d'un ion Y en sens inverse. La liaison du complexe Mg-ATP entrainant un changement conformationnel après phosphorylation du domaine P. Le changement d'affinité induit va permettre la libération de l'ion séquestré au sein du domaine M membranaire (d'après Kuhlbrandt, 2004).

3. l'ATP7B

3.1. Rôle physiologique

Les P-ATPases à cuivre, ATP7B et ATP7A, sont les deux grands acteurs du cycle cellulaire du cuivre. Homologues à plus de 50-60%, elles occupent pourtant des fonctions opposées qui expliquent leur différence de localisation. L'ATP7A, principalement exprimée au niveau du tube digestif, va permettre la libération du cuivre alimentaire dans la circulation sanguine au niveau du pôle basolatéral de l'entérocyte. L'ATP7A participe aussi à la biosynthèse de nombreuses enzymes à cuivre (tyrosinase, lysyl oxydase, cytochrome C oxidase, etc...). L'ATP7B réalise l'excrétion du cuivre principalement dans le foie qui est l'organe principal de détoxification de l'organisme. Le transporteur est également exprimé dans le cerveau, le rein, le placenta (plus de détails sur le profil d'expression dans la base de données NCBI UniGene Hs. 492280). Au niveau cérébral, l'ATP7B est beaucoup moins caractérisée que l'ATP7A, sa localisation étant difficile en raison de sa faible expression. Elle a été mise en évidence dans le cervelet de souris au niveau des neurones de Purkinje (Barnes *et al.*, 2005).

Une découverte intéressante qui pourrait faire le lien avec notre travail sur le système sérotoninergique – la mélatonine, qui est un dérivé de la sérotonine exprimée dans la glande pinéale – est la présence d'une isoforme exprimée dans la glande pinéale avec un pic d'expression chez le rat en période nocturne (Borjigin *et al.*, 1999).

Le profil d'expression de l'ATP7B permet d'expliquer seulement en partie la symptomatologie observée dans la maladie de Wilson provoqué par une perte de fonction de l'ATP7B. En effet l'ATP7B joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire du cuivre (Figure 15). L'ion rentre dans la cellule par l'intermédiaire du transporteur membranaire CTR1. Ensuite, il est pris en charge par la chaperonne à cuivre ATOX1. L'ATP7B intervient au niveau du trans-golgi en transférant le cuivre à la céruloplasmine (Cp) qui permet au métal de rejoindre la circulation sanguine sous forme d'un complexe (Cp-Cu). La concentration intra hépatocytaire de cuivre détermine la nature de la réponse fonctionnelle - biosynthétique ou homéostatique - de l'ATP7B. En effet, à l'état basal, l'ATP7B, localisée au niveau de l'appareil de Golgi, incorpore son substrat au sein de la céruloplasmine, c'est la voie « biosynthétique ». La fonction homéostatique de l'ATP7B intervient lorsque la concentration en cuivre s'élève, le transporteur migre alors du Golgi vers le compartiment apical de l'hépatocyte pour réaliser l'excrétion du

cuivre via les canalicules biliaires (pour une revue exhaustive sur la fonction et la régulation de l'ATP7B voir Lutsenko *et al.*, 2007).

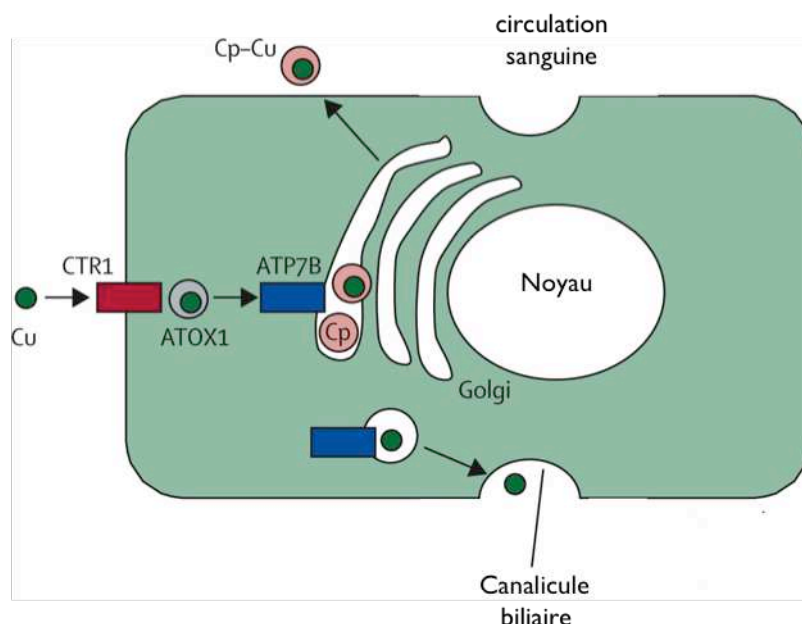


Figure 15. Cycle cellulaire du cuivre dans l'hépatocyte (d'après Ala *et al.*, 2007). Le cuivre (Cu) rentre par le transporteur CTR1. Il est pris en charge par la protéine chaperonne ATOX1 qui va transférer l'ion à l'ATP7B au niveau du trans-Golgi. Selon le taux de cuivre intra-cellulaire, l'ATP7B va soit transférer la cuivre à la céruloplasmine (Cp) soit réaliser l'excrétion via le canalicule biliaire.

3.2. Implication dans la maladie de Wilson

3.2.1. Généralités

La maladie de Wilson, ou « toxicose cuprique », est une maladie génétique autosomique récessive provoquée par la mutation d'un gène codant pour un transporteur cellulaire de cuivre, l'ATP7B. L'incapacité du foie à excréter le cuivre via les canalicules biliaires va provoquer des dépôts tissulaires toxiques pour de nombreux organes à l'origine de la morbidité de la maladie. Il n'existe pas de données épidémiologiques précises sur la fréquence de la maladie. En effet la prévalence varie en fonction de l'ethnie et le diagnostic est parfois difficile à établir du fait de l'hétérogénéité des signes cliniques. Une étude américaine estimerait sa prévalence autour d'un cas sur 55 000 naissances (Olivarez *et al.*, 2001). En France, l'incidence varie selon les estimations entre 1/30000 à 1/100000 nouveaux cas par an. La fréquence du portage hétérozygote est évaluée à 1/90 (Duclos-Vallée *et al.*, 2006). A titre de comparaison l'hémochromatose, qui est aussi une maladie génétique métabolique impliquant une accumulation d'ions métalliques (fer), a une prévalence d'environ 0,5% (Asberg *et al.*, 2001). La maladie de

Wilson, létale en absence de traitement, est une maladie chronique nécessitant une prise en charge spécialisée par des équipes pluridisciplinaires réunies au sein de centres de référence. Elle reste une maladie de bon pronostic disposant d'un traitement efficace, chose rare pour une maladie génétique. Les complications et la morbidité de la maladie résident surtout dans un diagnostic tardif favorisé par une accumulation lente et progressive de cuivre dans l'organisme et une variabilité génotypique très importante. La mutation du gène de ce transporteur au cuivre, l'ATP7B, va entraîner une augmentation du cuivre dans la cellule hépatique. Le cycle cellulaire du cuivre va être perturbé, l'ATP7B ne pouvant plus assurer ses fonctions d'excrétion et de distribution du métal via la conversion de l'apocéruléoplasmine en céruléoplasmine. Cette dernière est impliquée dans le transport extra-hépatique du cuivre en permettant la distribution de l'ion aux autres organes, la diminution du taux de céruléoplasmine étant un des signes biologiques de la maladie. Ceci entraînera des dommages oxydatifs via l'altération des mitochondries hépatiques et une libération du cuivre dans le sang qui va entraîner par voie de conséquence une accumulation de cuivre dans de nombreux organes (cerveau, rein, œil), expliquant ainsi l'hétérogénéité clinique de la maladie.

3.2.2. Manifestations cliniques

Le tableau clinique est très polymorphe, pouvant associer chez un même malade des troubles hépatiques, neurologiques et ophtalmiques. Le dysfonctionnement métabolique congénital se manifeste rarement avant l'âge de trois ans, révélant les énormes capacités de stockage du foie. Les premiers symptômes qui vont amener le patient à consulter ne vont apparaître qu'après une ou plusieurs décennies. Au moment du diagnostic, 45 % des patients présentent des signes hépatiques, 35 % des signes neurologiques et 10 % des troubles psychiatriques. Un des signes cliniques caractéristique de la maladie est la présence à l'examen ophtalmique d'un anneau de Kayser-Fleischer témoignant d'un dépôt péri-cornéen de cuivre. L'atteinte hépatique, plus fréquente chez l'enfant, de degré variable selon l'évolution de la maladie, couvre l'ensemble du spectre des maladies hépatiques, de l'hépatosplénomégalie asymptomatique jusqu'à l'insuffisance hépatocellulaire terminale. Dans la majeure partie des cas les atteintes hépatiques se manifestent sous forme d'une hépatite chronique active, associée ou non à une cirrhose, avec des signes cliniques peu spécifiques à type d'ictère et/ou d'ascite. Les cas

d'hépatites aiguës fulminantes, pouvant nécessiter une transplantation en urgence, sont heureusement bien plus rares (Gitlin, 2003). Les formes neurologiques, plus insidieuses, s'observent plutôt chez l'adulte ou l'adolescent. Les symptômes associent des troubles de la mimique, du langage et de l'écriture, des mouvements anormaux tels que des tremblements ou des mouvements parkinsoniens, des troubles de la coordination (ataxie) et de la contraction musculaire (dystonie). On décrit même un faciès de type « Wilsonnien » évocateur, avec un visage figé, la bouche légèrement entrouverte et un sourire permanent causé par l'hypertonie des muscles péribuccaux. Les modifications du caractère (labilité de l'humeur, hyperémotivité...), associées ou non à des troubles de l'attention peuvent contribuer, si la maladie de Wilson n'est pas évoquée, à retarder le diagnostic. Ces raisons expliquent pourquoi les formes neurologiques de la maladie peuvent passer inaperçues pendant l'adolescence, période où ces modifications du caractère sont fréquentes. Toutefois, des manifestations plus sévères de nature psychiatrique ne sont pas rares (bouffées anxieuses, psychose, dépression...) (pour revue voir Woimant *et al.*, 2006). Des atteintes hématologiques et articulaires ont également été rapportées. Etant donné l'importante variabilité phénotypique de la maladie même au sein d'une seule famille, l'apport de la biologie, de la génétique et éventuellement de l'imagerie vont être nécessaires pour poser le diagnostic.

3.2.3. Données biologiques

La cytolyse provoquée par l'accumulation prolongée de cuivre au niveau hépatique est reflétée indirectement par la détermination de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT, ALAT) plasmatiques. L'élévation de ces enzymes est souvent faible, le bilan biochimique de départ devra comporter un bilan hépatique complet (bilirubine, GGT, PAL...). L'atteinte hépatique fonctionnelle sera mise en évidence par la perturbation plus ou moins profonde du bilan d'hémostase (taux de prothrombine, facteur II,...). L'exploration complète du bilan cuprique reste l'élément biologique essentiel pour le diagnostic spécifique de la maladie. Il inclut les dosages plasmatique et urinaire du cuivre associé à celui de la céruléoplasmine. Sa concentration et celle du cuivre sanguin sont abaissées chez la plupart des malades, alors que les taux de cuivre urinaire et hépatique sont augmentés. Le taux de céruléoplasmine est à interpréter en tenant compte des variations physiologiques et pathologiques indépendantes de la maladie

elle-même. Elle fait en effet partie des protéines de la phase aigüe de l'inflammation, un taux « normal » peut être retrouvé chez un malade présentant un syndrome inflammatoire, une femme enceinte ou traitée par des œstrogènes (Chappuis *et al.*, 2005). Un nouveau marqueur a été proposé récemment pour pallier aux insuffisances de spécificité et de sensibilité de l'exploration biochimique classique de la maladie de Wilson. La mesure du cuivre échangeable – fraction du cuivre labile et complexé à l'albumine – par spectrométrie de masse donne des résultats très supérieurs avec une sensibilité et une spécificité approchant les 100% (El Balkhi *et al.*, 2011). Cet outil pourrait également servir comme marqueur de classification pour les 10% de sujets hétérozygotes qui peuvent présenter un bilan biologique 'standard' 'évocateur', alors qu'ils ne développeront jamais la maladie. Dans ce contexte, la génétique a considérablement amélioré la prise en charge initiale de la maladie, reléguant ainsi en dernière intention l'emploi de gestes chirurgicaux invasifs tels que la biopsie hépatique.

3.2.4. Diagnostic génétique

Le gène ATP7B a été localisé sur le bras long du chromosome 13 en 1993 (Tanzi *et al.*, 1993). Sa séquence comporte 21 exons. Il code pour une ATPase de type « P transporteur » de métaux dont la perte de fonctionnalité explique la pathogenèse de la maladie. Deux isoformes de la protéine ont été caractérisées : l'isoforme « a » est la protéine complète (1465 AA) et l'isoforme « b » est une protéine tronquée (1258 AA). Leur profil d'expression tissulaire diffère, le rôle de l'isoforme « b » restant mal défini. La protéine complète est surtout exprimée dans le foie, le cerveau et le rein, expliquant en partie la symptomatologie observée.

Les indications du diagnostic génétique sont double : identifier la mutation causale et permettre le diagnostic éventuel dans la fratrie d'un cas déjà documenté. L'identification de mutations causales est réalisée par le séquençage d'exons dans un ordre déterminé par la fréquence des mutations attendues. En effet, plus de 300 mutations causales et plus de 100 variants sont recensés dans la base de données génomiques de référence (Kenney *et al.*, 2007) dont plus de 40 dans le domaine N qui nous intéresse pour l'étude de modélisation (cf. Figure 16). Les malades étant le plus souvent hétérozygotes composites, la recherche de chacun des allèles est nécessaire. Devant l'impossibilité de tester l'ensemble des mutations connues, la stratégie de séquençage préconisée doit

inclure la recherche prioritaire des mutations les plus courantes dans l'ethnie du patient considéré. Par exemple, la mutation H1069Q représente entre 37 et 63 % des mutations retrouvées dans les études réalisées sur des sujets caucasiens mais semble être absente parmi les populations asiatiques chez lesquelles la mutation R778L est prépondérante (34-38 % des cas) (pour une revue plus exhaustive voir Ala *et al.*, 2007). Cette grande variabilité génétique explique pourquoi, dans 20 à 30 % des cas, aucune mutation connue ne peut être mise en évidence.

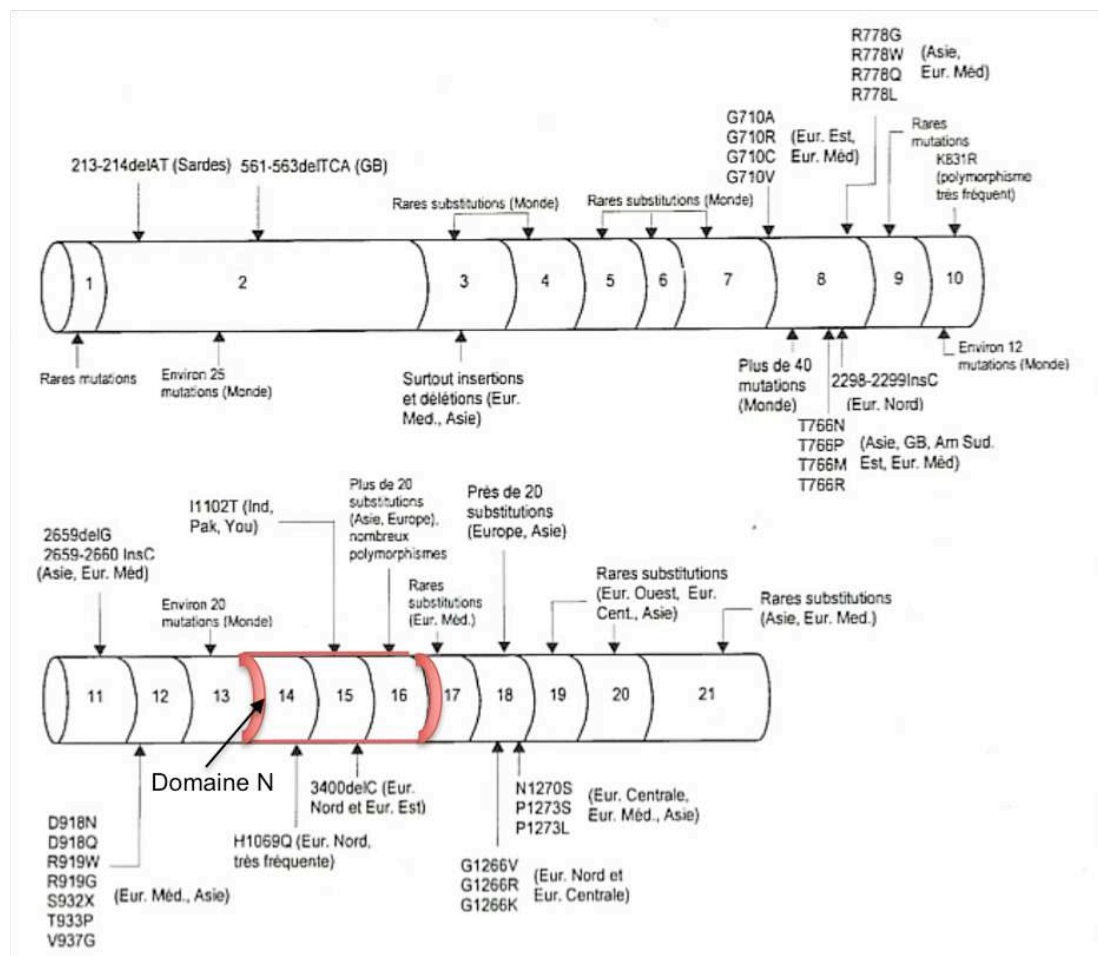


Figure 16. Principales mutations des 21 exons du gène ATP7B décrites dans la maladie de Wilson (d'après Chappuis *et al.*, 2007). Le domaine N est constitué par les exons 14, 15, 16.

3.2.5. Etude de la pathogénicité des mutations

L'étude de l'impact des mutations est fondamental pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie pour permettre *in fine* d'améliorer le diagnostic et la

prise en charge des malades. Nous nous intéresserons tout particulièrement aux données disponibles pour le domaine N qui sera l'objet de l'étude de modélisation moléculaire. Un modèle *in vitro* de complémentation a d'ailleurs été développé par une équipe canadienne pour étudier la pathogénicité de ces mutations. Ce test fonctionnel se base sur la capacité de l'ATP7B exprimée dans un modèle expérimental déficient en Ccc2p (protéine homologue à l'ATP7B chez la levure) de restaurer le phénotype sauvage (Forbes *et al.*, 1998). Etant donné la difficulté à obtenir ces modèles, leur utilisation en diagnostic génétique de routine n'est pas compatible avec le délai attendu pour le rendu de résultats. Toutefois, il reste l'un des seuls tests fonctionnels disponibles permettant d'appréhender concrètement l'impact des mutations. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre à des échelles différentes pour étudier les fonctions de l'ATP7B. La première approche étudie l'impact des mutations sur la fonctionnalité globale de la protéine en étudiant sa localisation cellulaire (au repos, en présence de Cu^{2+} ...), les interactions avec ses partenaires protéiques et l'effet sur son activité catalytique (liaison à l'ATP, phosphorylation/déphosphorylation...) (voir la revue exhaustive de de Bie *et al.*, 2007).

La seconde, au niveau moléculaire, décrypte les différentes étapes du cycle catalytique à travers les interactions interdomaines en présence de différents ligands (cuivre, ATP, GTP...). Ainsi, il a pu être montré par exemple que l'activation par phosphorylation, nécessaire au fonctionnement de la protéine, est dépendante du cuivre. La mutation *in vitro* de l'acide aspartique conservé (D1027) va abolir la capacité de translocation cellulaire permettant à l'ATP7B d'assurer sa fonction d'excrétion. En revanche, des mutations introduites dans le domaine de liaison au métal (DLM) ne l'abolit pas intégralement, ce qui suggère un site de fixation alternatif au cuivre (Cater *et al.*, 2007). Des approches globales comme les souris invalidées génétiquement (ATP7B^{-/-}) n'ont malheureusement pas apporté d'avancée notable dans la compréhension de la physiopathologie des mutations (Buiakova *et al.*, 1999).

3.2.6. Traitement

Le traitement comporte une prise en charge diététique et pharmacologique spécifique. Dans un premier temps, il est conseillé de réduire les apports en diminuant la consommation des aliments riches en cuivre (chocolat noir, fruits secs, coquillages,

etc...). La dose journalière absorbée en moyenne est d'environ 2-4 mg de cuivre avec une excrétion fécale autour de 0,8 mg/j. En complément de la restriction cuprique, les médicaments prescrits dans la maladie de Wilson doivent contribuer à l'excrétion urinaire quotidienne d'au moins 2 mg pour obtenir une balance cuprique négative. Le traitement pharmacologique préconisé doit être impérativement pris à vie pour éviter tout risque de rechute. L'amélioration clinique est lente (3 à 6 mois minimum) mais prolongée. L'amélioration va dépendre de la compliance du patient qui est souvent faible dans ce genre de maladie chronique. Les deux types de médicament utilisés sont les chélateurs du cuivre comme la D-Pénicillamine ou la triéthylènetétramine (TETA) et le zinc. La D-Pénicillamine (Trolovol®) est un dérivé de la cystéine qui va chélater le cuivre avec ses groupements thiols. Une aggravation des troubles neurologiques peut survenir en début de traitement avec ce médicament. Une des hypothèses avancées est la mobilisation trop rapide des stocks énormes de cuivre qui vont être redistribués préférentiellement vers le système nerveux. L'initiation du traitement doit donc se faire à dose progressive. Son utilisation fut pourtant unanimement recommandée durant de nombreuses années compte tenu de son efficacité clinique élevée. Cependant, 13 % des patients sont contraints d'arrêter leur traitement suite à l'apparition d'effets secondaires sévères (troubles digestifs, rash allergique, leucopénies...) (Wiggelinkhuizen *et al.*, 2009). A ceci s'ajoutent des manifestations délétères à long terme comme le syndrome de Goodpasture d'origine auto-immune, et des élastopathies mimant un vieillissement accéléré de la peau.

La TETA (Trientine®), moins efficace mais mieux tolérée, est utilisée comme alternative depuis plusieurs décennies (Walshe, 1982). Ce médicament chélate le cuivre grâce à ses fonctions amine libres, principalement au niveau du tube digestif. Etant un faible chélateur, son mécanisme d'action reste mal compris.

Le zinc, lui, est utilisé en relais des chélateurs du cuivre une fois que le patient est stabilisé. Il induit la synthèse d'une métallothionine intestinale qui a plus d'affinité pour le cuivre que pour le zinc, ce qui va diminuer l'absorption intestinale du cuivre. Ses effets secondaires sont quasi inexistantes, ils se résument à des troubles dyspeptiques dans 10% des cas. Aucune étude comparative solide n'est disponible à ce jour pour proposer l'utilisation du zinc en monothérapie comme traitement de première intention. Son efficacité est équivalente aux autres traitements quand il est prescrit en relais des chélateurs du cuivre (Czlonkowska *et al.*, 1996).

4. Etude de modélisation moléculaire

4.1. Données préliminaires

L'étude de modélisation moléculaire réalisée doit permettre de poser les bases pour la création d'un outil diagnostique dans un contexte où l'interprétation de mutations présentes sur le gène ATP7B reste délicate voire particulièrement difficile dans un contexte sémiologique non pathognomonique. L'approche structurale réalisée au cours de mon travail utilise les outils de la modélisation moléculaire et les données expérimentales disponibles afin de mettre au point un modèle d'étude 3D de la protéine. L'objectif est de réaliser ensuite une cartographie des zones à risques pour la protéine sauvage (ou Wild-Type). En effet, le domaine N est un domaine d'étude particulièrement intéressant avec plus de 40 mutations déjà décrites (Figure 17). L'interprétation des mutants va nécessiter dans un premier temps la réalisation d'un modèle 3D du Wild-Type (WT). Cette étude princeps est possible depuis 2006, date de la publication d'une structure RMN du domaine N de liaison à l'ATP de l'ATP7B (Dmitriev *et al.*, 2006).

La fixation de l'ATP au domaine N est étudiée en biologie depuis de nombreuses années, ainsi que les rôles des autres domaines. Par exemple, les différents motifs de liaison du cuivre (DLC) - au nombre de 6 pour l'ATP7B - ont la capacité de moduler l'affinité de la protéine pour l'ATP au niveau du site catalytique. Le mécanisme n'est pas clairement élucidé. La liaison du cuivre au DLC augmenterait l'affinité du nucléotide pour sa cible, en rendant le domaine de liaison à l'ATP (DLA) plus accessible (Tsivkovskii *et al.*, 2001), ce qui revient à envisager une régulation possible du DLA par le DLC.

Le DLA participe via le domaine N à l'étape primordiale du cycle catalytique qui voit la fixation du nucléotide. Des données sur le rôle de certains acides aminés dans l'interaction ATP-domaine N sont disponibles sans que le site de coordination exact n'ait pu être mis en évidence. Les effets sur la liaison et la conformation du domaine N en présence de différents nucléotides ont été testés sur la protéine sauvage ainsi que sur différents mutants impliqués dans la pathogenèse de la maladie (Morgan *et al.*, 2004). La fixation du nucléotide est spécifique, le GTP n'a pas d'affinité spécifique pour le domaine N. Néanmoins, des interrogations demeurent. En particulier, le rôle des phosphates β et γ dans la liaison du nucléotide qui n'est pas ainsi que celui de l'ion magnésium doivent être envisagés (cf. 4.4 Discussion et Perspectives). Concernant le repliement du domaine N, seule la mutation C1104F modifie le repliement 3D alors que la mutation C1104A n'a

que peu d'effet, suggérant ainsi que l'encombrement stérique engendré par la présence d'une phénylalanine diminuerait l'accessibilité au site de liaison putatif. Deux mutations perturbent significativement la formation des complexes nucléotide-protéine. Le remplacement d'une histidine par une glutamine en position 1069 (H1069Q) diminue considérablement l'affinité, la constante de dissociation K_d augmentant d'un facteur 16. L'importance de cette mutation a été évoquée dans la partie concernant le diagnostic biologique. L'effet de la substitution E1064A est encore plus marqué car il empêche tout simplement la liaison du nucléotide. Afin de répondre aux interrogations posées concernant le rôle du magnésium et de définir avec précision un site de coordination du nucléotide au sein du domaine N, une étude de modélisation approfondie a été réalisée.

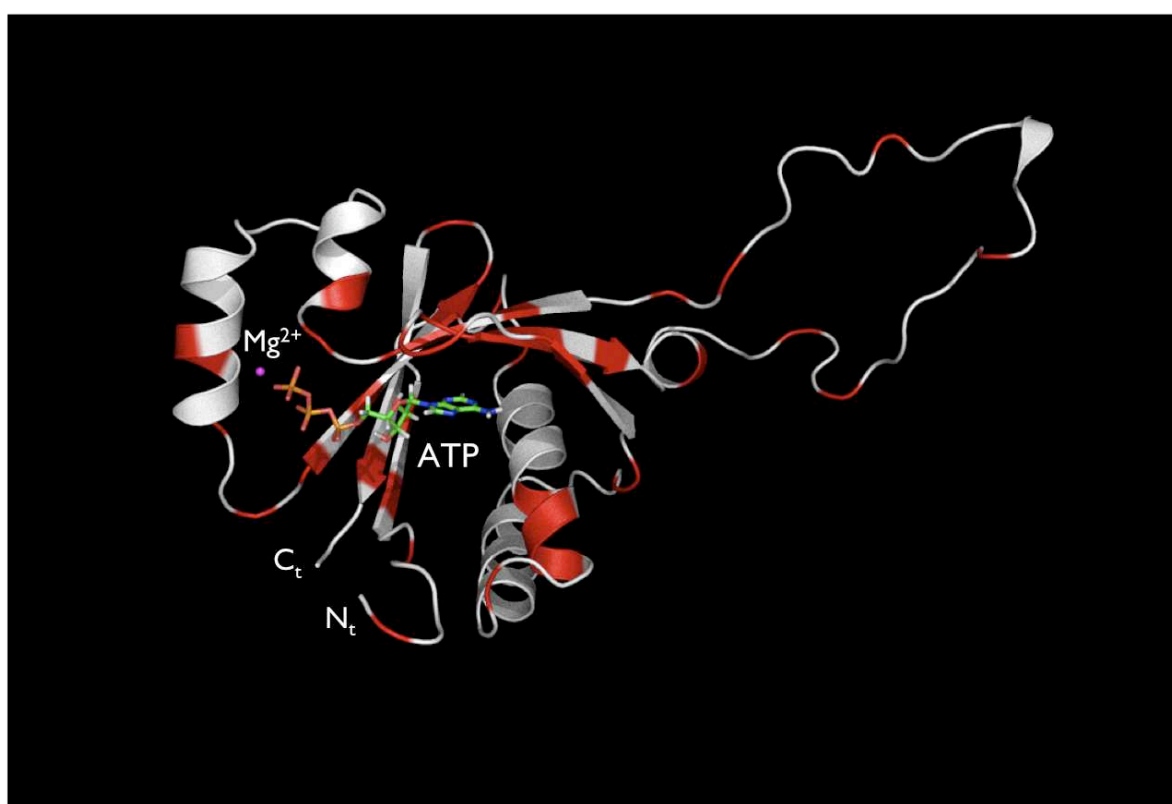


Figure 17. Représentation 3D du domaine N en présence du magnésium et de l'ATP. Les acides aminés qui sont mutés dans la maladie de Wilson sont colorés en rouge.

4.2. Etude de la dynamique de liaison à l'ATP (article 1)

Article 1 : *Elucidation of the ATP7B N-domain Mg²⁺-ATP Coordination Site and its Allosteric Regulation*

Claude Hercend, Cyril Bauvais, Guillaume Bollot, Nicolas Delacotte, Philippe Chappuis, France Woimant, Jean-Marie Launay, Philippe Manivet, *PLoS ONE* **6**, e26245 (2011).

Elucidation of the ATP7B N-Domain Mg^{2+} -ATP Coordination Site and Its Allosteric Regulation

Claude Hercend^{1,2}, Cyril Bauvais³, Guillaume Bollot³, Nicolas Delacotte³, Philippe Chappuis¹, France Woimant⁴, Jean-Marie Launay^{1,2}, Philippe Manivet^{1,5,6*}

1 APHP, Hôpital Lariboisière, Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Paris, France, **2** INSERM U942, Biomarqueurs et Insuffisance cardiaque, Hôpital Lariboisière, Paris, France, **3** Division of Structural Biology, Bioquanta, Paris, France, **4** APHP, Hôpital Lariboisière, Service de Neurologie, Paris, France, **5** INSERM U829, SABNP Laboratory, Evry, France, **6** Université Evry Val-d'Essonne, Evry, France

Abstract

The diagnostic of orphan genetic disease is often a puzzling task as less attention is paid to the elucidation of the pathophysiology of these rare disorders at the molecular level. We present here a multidisciplinary approach using molecular modeling tools and surface plasmonic resonance to study the function of the ATP7B protein, which is impaired in the Wilson disease. Experimentally validated *in silico* models allow the elucidation in the Nucleotide binding domain (N-domain) of the Mg^{2+} -ATP coordination site and answer to the controversial role of the Mg^{2+} ion in the nucleotide binding process. The analysis of protein motions revealed a substantial effect on a long flexible loop branched to the N-domain protein core. We demonstrated the capacity of the loop to disrupt the interaction between Mg^{2+} -ATP complex and the N-domain and propose a role for this loop in the allosteric regulation of the nucleotide binding process.

Citation: Hercend C, Bauvais C, Bollot G, Delacotte N, Chappuis P, et al. (2011) Elucidation of the ATP7B N-Domain Mg^{2+} -ATP Coordination Site and Its Allosteric Regulation. PLoS ONE 6(10): e26245. doi:10.1371/journal.pone.0026245

Editor: Hendrik W. van Veen, University of Cambridge, United Kingdom

Received: January 9, 2011; **Accepted:** September 23, 2011; **Published:** October 27, 2011

Copyright: © 2011 Hercend et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The "Bernard Pèpin" Wilson Disease Patients French Association, BioQuanta Corp, Colorado, USA, APHP, Paris University Hospitals. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: JML and PM are member of the advisory board of Bioquanta and they confirm that this does not alter their adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the PLoS one guide for authors. .

* E-mail: philippe.manivet@lrb.aphp.fr

Introduction

The Wilson disease (WD, OMIM 277900) is due to mutations in a copper transporter gene coding for the protein ATP7B that belongs to the P-type ATPase superfamily [1]. It is a rare and serious inherited sickness with the main clinical manifestations resulting in a systemic copper accumulation (liver, brain...). The incidence of this autosomic recessive disease is estimated at one for 30,000 to one for 100,000 individuals depending on the ethnicity of the affected population [2]. With a wide clinical spectrum and a slow progressive evolution, since liver will tolerate copper accumulation, early clinical diagnosis of WD remains difficult. This explains why patient condition is so serious when symptoms appear, like liver disease such as cirrhosis, neurologic disturbances or even psychiatric signs [3]. The standard diagnostic is based on the exploration of copper metabolism (copper, caeruloplasmin...) and molecular analysis of ATP7B gene mutations. The genetic diagnosis is difficult and may sometimes be a bottomless problem since WD has a marked genetic heterogeneity and most of the affected individuals are compound heterozygotes. Indeed, with a gene coding region of 4.3 kb and 21 exons, a full PCR amplification is out of reach in daily laboratory routine. Besides, more than 300 different mutations and 100 genetic polymorphisms have been published so far [4]. Even though some mutations are more frequent depending on the tested population, e.g. H1069Q in Caucasians [5] and R778L in Asians [6]. The pathogenesis of the disease is better understood since the discovery of the culprit gene (*At7b*) in 1993 [7]. The function of the protein

in copper metabolism has been studied by using biochemical assays [8], cellular (hepatocytes) and *in vivo* models to decipher its cellular trafficking that mediates the export of the ion in different organs [9]. Human ATP7B is a copper ATPase (P35670) that shares the general domain organization of P-ATPases (Figure 1A). This transmembrane protein contains four domains with both N- and C-terminal ends located in the cytosol. An original metal binding site is composed of six distinct Copper Binding Domains (CBD) located in the N-terminal cytosolic part of the protein. The other domains are the Actuator domain, the Phosphorylation domain (P-domain) and the Nucleotide-binding domain (N-domain). This latter domain holds the ATP binding site and plays a major role in the catalytic cycle (Figure 1B). Experiments have been dedicated to the study of the impact of ATP7B mutations. Alterations of the molecular integrity of the ATP7B are responsible of a partial or total loss of function. For instance, yeast complementation assays have been successfully used to study ATP7B function. Despite being time consuming and highly skilled techniques, they allowed a deeper understanding of the pathogenic impact of mutations identified in different regions such as ATP-binding region composed of the N- and P-domain [10].

In parallel, structural studies concerning different domains of the ATP7B protein have been published. The N-domain structure studied in the present work was first obtained by NMR [11], followed by CBD5 and CBD6 [12]. Further studies led to the elucidation of CBD3 and CBD4 structures [13]. More recently, the Actuator domain (A-domain) of ATP7B was solved by heteronuclear NMR spectroscopy [14]. ATP is crucial for ATP7B

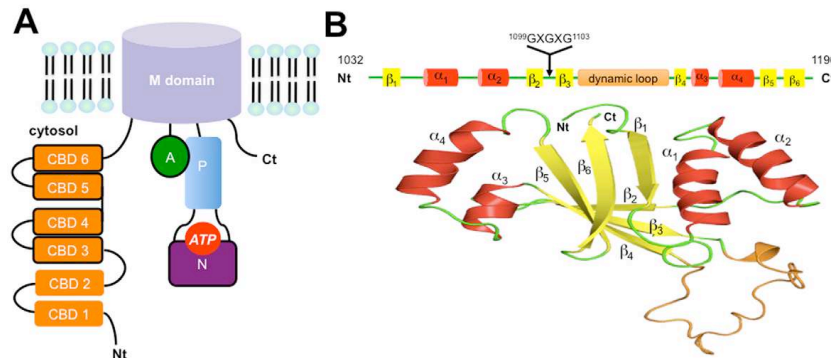


Figure 1. General organization of the ATP7B protein. (A) The different domains of the protein are presented: the six Copper Binding Domains (CBD), the transmembrane domain (domain M), the Actuator domain (A), the Phosphorylation domain (P) and the Nucleotide-binding domain (N). The different domains, which have been structurally characterized, are framed in black. (B) Sequence and structure available for the N-domain. Secondary structures and the dynamic loop are shown along with the position of the poly-glycine loop (GXGXG). doi:10.1371/journal.pone.0026245.g001

function since phosphorylation initiates conformational changes in ATP7B that promote copper transport. The topology of the ATP binding site remains to be precisely defined despite NMR data available of the N-domain without and with ATP showing the existence of chemical shifts signals between ATP and protein residues belonging for instance to a poly-glycine loop [11]. However, Mg^{2+} ion is always absent from all structural and molecular modeling studies [11,15,16] despite the experimental demonstration of its great participation to the N-domain ATP affinity [17]. Most of all, attempts were made to clarify ATP/N-domain interactions without considering the role of the ion. Therefore, no clear nucleotide-binding site could have been proposed. The N-domain of the human ATP7B protein bears an intriguing long loop (A1114 - T1143) connected to the poly-glycine loop, which is absent in the ATP binding domain of other proteins of the P-ATPase family (SERCA, ZntA, CopA...) [18]. All the above observations, together with currently available unconvincing genotype-phenotype correlation data [19], call for the emergence of alternative methods such as molecular modeling, to investigate WD mutants with a clear protocol and highly accurate tools.

In the present study, the wild type (WT) N-domain structure was investigated by molecular dynamics (MD) simulations. The 3D structure of the apoform of the ATP7B N-domain [11] was used as a starting point to characterize the amino acids involved in the nucleotide binding of the wild type protein (WT). By means of 3D structural alignments and MD simulations validated by binding affinity measurements, an original ATP binding site is proposed where Mg^{2+} ion is hexacoordinated by the nucleotide and carboxylate residues of protein. The *in silico* 3D model proposed here also provides answers to the controversial issue on the magnesium role in the process of ATP binding as well as its impact on the dynamic of the N-domain. We propose a mechanism for the transition of the nucleotide between two binding modes (+/- Mg^{2+}) with the allosteric participation of a long protruding loop.

Results

Elucidation of the N-domain Mg^{2+} -ATP coordination site

Before interpreting the structure/function relationships of Wilson disease mutations and studying Mg^{2+} -ATP binding, the

first step has been the generation and experimental validation of the 3D models for ATP7B. The NMR structure of the N-domain has been solved without ATP coordinates, the precise binding site of ATP being still under debate. Experimental NMR data is available that could help to locate the binding site. Signals have been identified between ATP and G1099, G1101, G1149 and N1150 residues, suggesting a close proximity with ATP [11].

Compared to other P-ATPases, structural information is lacking for the P_{Hb} -ATPase subtype concerning the direct interaction between the N-domain and ATP molecule [20]. This emphasizes the question about the definition of the ATP coordination site of ATP7B N-domain as well as the role of magnesium and the two glycine amino acids (G1099, G1101) previously mentioned. These two glycines, which are conserved in the P_{Hb} subtypes, belong to a region mentioned as a poly-glycine loop (¹⁰⁹⁹GXGXG¹¹⁰³). This region has already been considered to be important in nucleotide binding to the Zn^{2+} transporting ATPase (ZntA) [21].

We first identified the N-domain residues capable of interacting with Mg^{2+} . According to the statistical analysis performed with a bioinformatics database, the most probable residues able to coordinate Mg^{2+} are aspartic (33%) and glutamic (18%) acids (Figure S1). Then, we refined this analysis by mapping the N-domain protein surface with a spherical pharmacophore especially designed for respecting the specific geometrical and chemical constraints for an ideal Mg^{2+} -ATP binding site (see Methods section). The Figure S2 shows the result of the pharmacophoric search that reveals a unique possible Mg^{2+} coordination site. This site is located in a region of the protein carrying a "DDE" structural signature between α_3 and α_4 helices involving side-chain oxygen atoms of residues E1152, D1167 and D1171 (Figure 2A). In addition, the Mg^{2+} binding site proposed is located nearby the region known for participating to ATP binding (G1099, G1101, G1149 and N1150).

To validate first the magnesium coordination proposed here and prior to the interpretation of the nucleotide binding effect studied by MD simulations, structural analysis of binding structural analysis of binding sites has been performed. More than 300 nucleotides binding sites using Mg^{2+} ion and ATP have been analyzed (see Methods section). The presence of aspartic and glutamic residues in these Mg^{2+} -ATP binding sites reinforces the

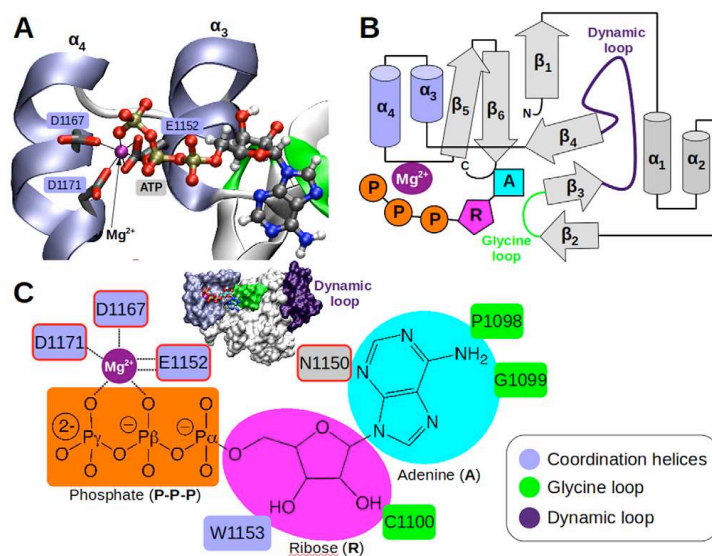


Figure 2. Mg^{2+} -ATP coordination site within the N-domain (WT-Mg-ATP complex). (A) The surface of the protein is displayed with the main regions implied in interactions with ATP that are colored following the internal text label. A close view of the binding pocket is presented with α_3/α_4 helices (light blue) in ribbon representation with amino acid side-chains and ATP, with Mg^{2+} ion (purple sphere), in ball and stick representation. Carbon, oxygen, nitrogen, and phosphorous atoms are colored in gray, red, nitrogen, and orange, respectively. (B) Topological diagram of the secondary structures of the N-domain. Cylinders and arrows represent α -helices and β -strands, respectively. The nucleotide is shown with three different parts: Adenine (blue), Ribose (magenta) and Phosphate tail groups (orange). For illustration, glycine and dynamic loops are colored in green and purple, respectively. (C) 2D representation of the singular amino acids involved in direct interaction with magnesium ion or ATP atoms. Amino acids framed in red have been mutated (see Experimental section). doi:10.1371/journal.pone.0026245.g002

validity of the “DDE” motif used for positioning the magnesium ion (Figure S3).

Experimental validation of the Mg^{2+} -ATP coordination site

The contribution of the different regions of the protein taking part in the interactions with the nucleotide (phosphate tail, ribose and adenine moieties) was “tested” experimentally. The aim was to validate the binding site proposed through binding measurements of the nucleotide with Wild Type (WT) and mutated forms of the N-domain (Table 1). It shows first that the presence of the magnesium ion increases the nucleotide affinity of more than 30% for the N-domain. The dissociation constant (K_d) for the WT decreases from $74.25 \pm 2.52 \mu\text{M}$ (ATP alone) to $51.94 \pm 2.79 \mu\text{M}$ (ATP, Mg^{2+}). The substitution of any of the three residues of the “DDE” motif coordinating the Mg^{2+} -ATP complex with an alanine (E1152A, D1167A or D1171A) significantly decreases the affinity for the nucleotide. The increase of the K_d ranges from 33% (D1171A) to more than 146% (E1152A) for Mg^{2+} -ATP. Mutation of E1152A has the most marked impact on the ATP and Mg^{2+} -ATP bindings. This may suggest a major role for the E1152 residue in the stabilization of the nucleotide. However, single point mutations do not prevent, if they markedly reduce, neither ATP nor Mg^{2+} -ATP binding. The role of these “DDE” residues is evidenced by the absence of specific Mg^{2+} -ATP binding to the N-domain ($K_d > 1 \text{ mM}$) for the triple mutant (E1152A+D1167A+D1171A). It is interesting to note that this triple mutation also

prevents ATP binding. To prepare the positioning of the nucleotide in the molecular modeling study, the N1150 was mutated to alanine (N1150A). This residue has been described previously as “close contact” with ATP. As for the others mutants, N1150A shows an increase in ATP binding affinity in presence of Mg^{2+} (17%). Compared to the WT, there is a slight perturbation of the ATP binding evidenced by the 11–33% drop of the K_d (+/– Mg^{2+}).

MD simulation study of the WT-Mg-ATP complex

Once the Mg^{2+} coordination site has been “validated”, a new ATP binding site could be proposed, taking into account all experimental and structural information already gathered (Table S1). The nucleotide was first positioned by molecular docking and was allowed to evolve along the MD simulation process to ensure proper Mg^{2+} -ATP positioning through coordination of the phosphate tail. First, the N-domain was simulated through two different systems for 50 ns: WT and WT-Mg-ATP. Then, the structural validation of these two models was performed. The validation of the *in silico* models was done by comparing theoretical NMR chemical shifts to experimental data [22]. The Figure S4 shows an excellent agreement between calculated and experimental chemical shifts for C_α carbon atoms of the N-domains. A high correlation coefficient ($R \geq 0.95$) and a small dispersion of the scatter plot indicate that our 3D models are accurate. For the MD simulation, the stabilization of the Root Mean Square Deviation (RMSD) is achieved after 30 ns for the WT-Mg-ATP and WT

Table 1. Nucleotide binding affinity for the N-domain of Wild Type and mutant proteins.

N-domain	K_d (μ M)	
	ATP	ATP, Mg^{2+}
Wild-type (WT)	74.25 \pm 2.52	51.94 \pm 2.79
E1152A	174.31 \pm 3.82**	128.84 \pm 2.74**
D1167A	96.92 \pm 3.91**	80.96 \pm 2.52**
D1171A	81.12 \pm 3.16*	68.04 \pm 2.71*
E1152A+D1167A+D1171A	no binding**	no binding**
N1150A	82.74 \pm 4.16*	68.33 \pm 2.82*
Δ 1121–1137	no binding**	no binding**
H1069Q	76.52 \pm 1.72	54.37 \pm 1.66

The affinity is presented here via the dissociation constant K_d for the complex: N-domain- Mg^{2+} -ATP (left column) and N-domain/ATP (right column). The amino acids belonging to the coordination helices are highlighted in light blue, the deletion of the dynamic loop is shown in purple.

No binding ($K_d > 1$ mM),

* $P < 0.05$,

** $P < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0026245.t001

systems as shown in Figure 3A. The global structure of the N-domain interacting with Mg^{2+} -ATP shows a similar behavior to the nucleotide free N-domain. This is evidenced by the calculations of the RMSD: 9.9 Å and 8.6 Å for the RMSD of the N-domain alone (WT) and interacting with Mg^{2+} -ATP (WT-Mg-ATP), respectively. The same result is obtained when the evolution of the RMSD is measured by excluding the “dynamic” loop (A1114-T1143). A similar trend is observed for the radius of gyration evolutions (Figure 3B). The R_g fluctuates around an average value of 16.5 Å for WT and 15.6 Å for the WT-Mg-ATP systems. Ramachandran plots show an increase in geometrical relaxation parameters for the structures of the N-domain between the initial and the representative structure of the last 20 ns of MD simulations (Figure S5). The initial WT N-domain structure has 73% of amino acids residues in the most favourable regions, whilst the representative structure of the last 20 ns of MD simulations reaches 84% for the WT and the WT-Mg-ATP systems.

Based on these MD preliminary results, we further investigated the Mg^{2+} -ATP coordination site on the WT-Mg-ATP model. The position of the nucleotide for the representative structure of the last 20 ns of MD simulation is shown in Figure 2A. The magnesium ion is located near α_3 and α_4 helices (coordination helices). They bear the “DDE” motif and are located close to the glycine loop (¹⁰⁹⁹GXGXG¹¹⁰³). The Figure 2B shows an overall “picture” of the new binding site where the adenine part of the nucleotide is located near the glycine loop and the β -sheets “core” of the N-domain. A close view in the nucleotide-binding environment is shown (Figure 2C). The magnesium ion is hexacoordinated via an octahedral geometry by the amino acids of the “DDE” motif (E1152, D1167, D1171) and oxygen atoms of the β -/ γ -phosphate group of ATP. For the ribose part, N1150, W1153 and C1100 are the main protein residues in close interaction. The hydrogen bond between the backbone of C1100 (C=O) and one of the hydroxyl groups of the ATP ribose moiety has a 22% lifetime. The adenine moiety interacts essentially with P1098, G1099 of the glycine loop. The N1150 side-chain also interacts with one nitrogen atom of the adenine moiety. The E1152 residue interacts with the ion through bidentate coordination (Figure S6). In the WT-Mg-ATP MD simulation, the Mg^{2+} coordination is stable as shown by the

average Mg^{2+} -O distance (Figure S6). For the oxygen atoms of the side-chains of the “DDE” motif (E1152, D1167, D1171) and for the part of ATP interacting with the ion, the Mg^{2+} -O distance is close to 2 Å ([1.84 Å– 1.96 Å]). This is compatible with previous structural data available on magnesium binding in proteins [23]. Neither the residues surrounding the coordinating sphere nor water molecules of the bulk solvent were able to induce any perturbation of the Mg^{2+} -ATP coordination throughout the duration of MD simulation. The stabilization of the RMSD obtained after 30 ns for both simulations and the structural validation allow a further analysis of the nucleotide binding impact on each region of the N-domain. The general trend is a decrease in the atomic fluctuations for several regions of the protein when Mg^{2+} -ATP is bound to the N-domain (Figure 3C). It appears that, at least, the movements of three regions are influenced by the presence of the nucleotide: the poly-glycine loop, the “dynamic” loop and the “coordination helices”. The glycine loop that is located between the two β -strands (β_2 , β_3) and the dynamic loop, shows a noteworthy stabilization in the presence of the nucleotide. For example, the presence of ATP decreases the fluctuation of residues 1091–1099 with P1098 being the most important affected residue (2.3 Å versus 0.6 Å without ATP). The ATP presence under the loop enforces the two β -strands to accommodate their relative position. A hydrogen bond network rearrangement is occurring between the two β -strands with an increase in plasticity of the β_2 , which demonstrates a high potential of structural accommodation. The most marked effect of the Mg^{2+} -ATP binding on the motions of the protein is observed for the long dynamic loop (A1114-T1143). Mg^{2+} -ATP interactions reduce substantially the motion of several residues i.e. E1117 (–1.8 Å), R1118 (–2.6 Å), P1119 (–3.2 Å), L1120 (–3.4 Å), S1122 (–2.5 Å). The fluctuation of the “coordination helices” is also decreased. Indeed, the most significant difference between the MD simulations with or without Mg^{2+} -ATP is seen for T1170 (–1.8 Å) and E1171 (–1.4 Å).

ATP binding site without Mg^{2+}

To assess the effect of Mg^{2+} on ATP binding to the N-domain, MD simulation was performed without the ion (WT-ATP system). The absence of the ion induces conformational changes in the N-domain with a major rearrangement concerning the α_3 and α_4 helices that can be explained by a decreasing structural order through MD simulation results of WT-ATP system. For the WT-ATP system, the stabilization of RMSD occurs after 20 ns (Figure S7A).

Computational results show that in absence of Mg^{2+} , the N1150 is still in the vicinity of ATP molecule and interacts in this case (WT-ATP) with the phosphate moiety (O-P γ) through hydrogen bond interaction (2.11 Å). Instead of interacting with Mg^{2+} ion (WT-ATP-Mg system), the D1171 amino acid forms a strong hydrogen bond with the hydroxyl group of the ribose moiety in absence of Mg^{2+} (WT-ATP system) (Figure S7B). In addition, the adenine moiety is encapsulated by M1035, P1098, I1102, I1138, G1149, M1174, I1180, and I1194 residues defining a hydrophobic pocket. Moreover, the amine group of adenine moiety forms hydrogen bond with carbonyl backbone of C1100 amino acid (2.87 Å). Molecular modeling results are confirmed by experimental data showing that ATP is able to bind the N-domain without the magnesium ion (Table 1). However, the affinity of the N-domain for ATP is 45% lower when Mg^{2+} is absent. All the above results suggest a more complex interaction between the N-domain and ATP than it has been previously suggested and reinforces the validity of a new ATP binding mode in absence of Mg^{2+} ion.

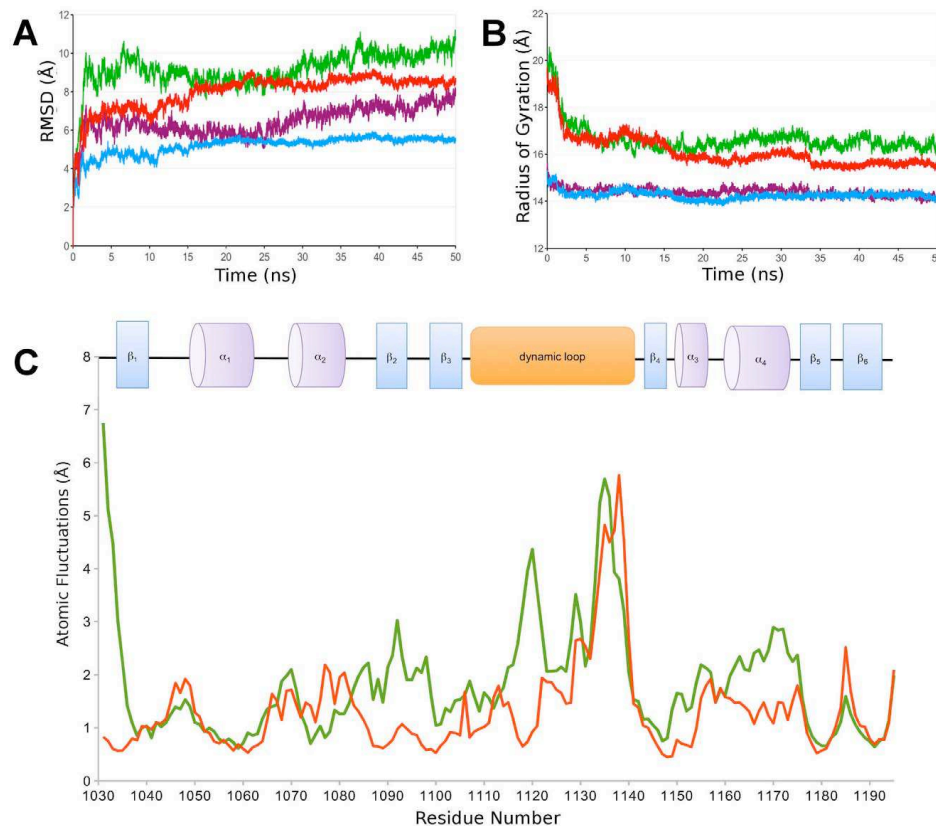


Figure 3. Analysis of the N-domain plasticity along MD simulations for WT and WT-Mg-ATP systems. (A) Root Mean Square Deviation (RMSD) of the C_{α} atoms with the initial minimized structure used as reference for the 50 ns of MD simulations: whole Wild-Type protein of the N-domain (WT, green) and Mg^{2+} -ATP complexed to the N-domain (WT-Mg-ATP, red). Purple and blue colors represent the RMSD of the C_{α} atoms calculated without taking into account the dynamic loop (A1114-T1143) for WT and WT-Mg-ATP system, respectively. All structures were previously fitted to the initial structure of the MD simulation considering the WT for all trajectories. (B) Radius of gyration of C_{α} atoms for WT and WT-Mg-ATP systems. Color scheme is the same as previously defined. (C) Atomic fluctuations of C_{α} atoms for WT (green) and WT-Mg-ATP systems (red). doi:10.1371/journal.pone.0026245.g003

Impact of the “dynamic loop” motion on Mg^{2+} -ATP binding

As evidenced in the dynamic study of the Wild Type N-domain (WT), the motion of the long loop located between A1114 and T1143 is influenced by the presence of Mg^{2+} -ATP. This striking change of motion suggests a possible contribution of this loop in ATP binding. Located between β_3 and β_4 (Figure 3B), this loop is only present in human P-ATPases such as ATP7B and ATP7A. The latter is a copper transporter highly homologous to the ATP7B protein, implicated in Menkes disease [24]. This explains why the role of this loop remains unknown besides an increasing numbers of structural studies actually available for these enzymes. According to the results obtained for the atomic fluctuations of the long loop, further investigations have been made to understand the role of this peculiar loop in the ATP7B function. First, the effect of

the loop on the nucleotide binding was evaluated experimentally by the measurement of the K_d for a mutant protein with a shortened loop (deletion of residues 1121–1137). Unexpectedly, the absence of this loop suppresses the binding for both ATP and Mg^{2+} -ATP (see Table 1). In order to understand these results and to elucidate furthermore the role of this loop in the N-domain dynamic response and its influence on the nucleotide binding process, one additional MD simulation has been performed. For this purpose, a new 3D model was built with the long “dynamic” loop substantially shortened (Shortened Loop SL, cf. Methods). No alteration of overall protein folding has been noticed, compared to WT-ATP-Mg model. The RMSD obtained for the SL-Mg-ATP system shows stabilization after 20 ns of MD simulations (Figure S8A). The Mg^{2+} -ATP binding site is altered in absence of the whole loop with a re-organization of the magnesium coordination

sphere (SL-Mg-ATP system). D1167 from the “DDE” motif is evicted and replaced by a water molecule (Figure S8B). The coordination helices lose their structural integrity. This allows the nucleotide to change its relative position concerning the coordination helices and the poly-glycine loop. It goes further “inside” the β -sheet core of the protein composed of a hydrophobic groove (I1119, I1180, I1194). The phosphate part of ATP is stabilized via an interaction with R1156. The adenine moiety loses its main interactions. These preliminary data on the loop role suggest interdependence between the motions of the dynamic loop and the Mg^{2+} -ATP binding site via a possible affinity modulation of the Mg^{2+} -ATP/N-domain complex.

Discussion

Like in the case of WD, access to *in silico* technologies for studying the pathophysiology of rare genetic disorders, bring additional arguments for facilitating the diagnostic and the prognostic of diseases that are sometimes difficult to establish. A prerequisite for the study of the impact of point mutations on a protein structure is to understand its natural structural properties like folding, atomic motions, conformational changes, interaction with cofactors, etc. In the present work, the focus was the identification of the Mg^{2+} -ATP complex binding site of the N-domain (WT). The scientific literature is abundant on P-ATPases. Many studies are focused on their catalytic cycle with an emphasis on the phosphorylation step [25] and the general role of ATP [20]. Less attention has been paid to the nucleotide-binding step. Structural studies have been published using molecular modeling tools to decipher at the molecular level the interactions between the protein and the nucleotide. For ATP7B, the first molecular modeling study was anterior to the publication of the NMR structure of the N-domain [15]. The putative three-dimensional (3D) model of the N-domain was obtained by homology modeling using the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) as a structural template. The study did not lead to significant results concerning the ATP binding process. The low primary sequence homology between the N-domain of ATP7B and SERCA (20%) led to a poorly accurate 3D model with two putative ATP binding configurations proposed in the same protein without any presence of Mg^{2+} . Most of all, no experimental validation of the molecular interactions has been performed.

For the other members of the closely related P-ATPases, no molecular dynamics study of the nucleotide coordination is yet available. An NMR structure has been recently solved for the N-domain of ATP7A in the nucleotide bound (without Mg^{2+}) and nucleotide free forms [26]. An observation of the ATP-bound structure (PDB Id. 2KMX) shows an overall domain organization similar to the ATP7B N-domain. However, the topology of the ATP7B nucleotide-binding site is rather different especially for the phosphate groups. Both proteins share key residues: P1098 (P1087 for ATP7A), G1099 (G1116), G1101 (G1118), N1150 (N1184). Another key element is the sequence conservation in both N-domains of the residues belonging to the “DDE” motif responsible of the Mg^{2+} -ATP coordination in the WT-Mg-ATP model: E1157 (E1186), D1167 (D1201), and D1171 (D1205). The absence of Mg^{2+} in the ATP7A NMR structure could explain the differences observed in the nucleotide environment of two proteins. The possible modification of ATP conformation in presence of Mg^{2+} has been briefly evoked in the NMR study of the ATP7B N-domain [11] suggesting the existence of two different binding “sites” with different affinities for ATP. This hypothesis could explain the difference of the experimental K_d obtained for the WT in magnesium free or bound form (Table 1).

In order to challenge this assumption, MD simulations have been performed for the wild type ATP7B N-domain in interaction with either ATP or Mg^{2+} -ATP (WT-ATP and WT-Mg-ATP systems). Indeed, ATP alone could accommodate its position by migrating towards a hydrophobic groove after the removal of the magnesium ion. The charge repulsion between phosphate tail of ATP and acidic side-chains of the residues belonging to the “DDE” motif of the Mg^{2+} coordination sphere could help ATP to shift. Two binding modes could exist in the N-domain whether the ion is present or not. The first binding mode needs Mg^{2+} for ATP binding to be tightly stuck to the N-domain, the second being a transitory binding mode before the migration of the nucleotide towards the P-domain. Indeed, the γ -phosphate hydrolysis is thus not possible for phosphorylation of the P-domain since it is engaged in the ion coordination through its oxygen atoms. For proper P-domain phosphorylation, ATP has to be separate from Mg^{2+} . This transition might be possible through a conformational change of the N-domain (see below for Discussion about the dynamic loop) since the N-domain and Mg^{2+} -ATP complex are stuck together through very strong electrostatic interactions. It would be interesting to test this hypothesis with a 3D model of N-/P-domains together to study the whole process from the nucleotide-binding step to the phosphorylation. This hypothesis is in agreement with the fact that Mg^{2+} -ATP complex has to change its coordination when approaching the P-domain in order to allow its phosphorylation at D1027, as evidenced in a previous study concerning the SERCA structure solved in presence of ATP and Mg^{2+} [27]. A recent study of the CopA protein, a bacterial homolog of ATP7B, clearly brings a bundle of arguments in the favor of our hypothesis. In the crystal structure of the protein solved with an ATP analogue in presence of the magnesium ion [28], the nucleotide is bound in “sandwich” between the N- and P-domains nearby H1069 but not directly interacting with, and associated on the P-domain side with a hexacoordinated Mg^{2+} ion. It is interesting to note that there is no equivalent “DDE” triad in the N-domain of the CopA. More recently, a nearly complete X-ray structure has been published for this protein [29]. The presence of a magnesium ion near the DKTG motif at the interface of the P- and the A-domain support our hypothesis and could help to elucidate the full transfer of Mg-ATP from N- to P-domain during the acyl-phosphorylation process.

The previously published structural studies on the N-domain have neglected the role of the Mg^{2+} ion, although experimental evidences have pointed out the major role it plays in the nucleotide-binding mode of different P-ATPases. An original experimental protocol was used to study the ATP binding site of the Na^+/K^+ ATPase with Fe^{2+} ions capable of replacing Mg^{2+} [30]. A direct interaction was proposed between an ATP- Fe^{2+} complex and the aspartic acid side-chains of the “VADGA” motif (N-domain). Similar results for the SERCA have been confirmed by the interactions of residues of the N-domain and Mg^{2+} -ATP [31]. The results obtained in the present study prove the essential role of the ion in the nucleotide binding to the N-domain as it accounts for a substantial part of the binding affinity. These results are in agreement with the previous experimental study published by Morgan *et al.* [17]. Indeed, a significant increase in affinity was measured with similar results for the K_d : 75.30 μM (± 3.62) for ATP alone to 57.00 μM (± 3.00) for the Mg^{2+} -ATP complex (Table 1). It was concluded surprisingly that the nucleotide binding to the N-domain is a magnesium-independent event despite contradictory experimental results. The reason was that no high-affinity binding has been observed in presence of N-domain and magnesium alone. Unfortunately, this publication has been often referred for justifying the lack of Mg^{2+} participation in

ATP binding. Several other arguments sustain that Mg^{2+} always helps nucleotide to bind optimally to the protein target. It is well known that Mg^{2+} is essential for the catalytic activity of a wide range of enzymes using a nucleotide as cofactor (kinases, G-proteins, polymerases, etc, for review see reference [32]). In addition, the very low intracellular proportion of ATP in the free form, the cytosolic abundance of Mg^{2+} ($\sim 10^{-3}$ M) and the important stability of the Mg^{2+} -ATP complex ($K_d \approx 10^4$ M) explain why this complex is the major active form of the nucleotide [33]. This has been confirmed in muscle tissues where Mg^{2+} -ATP accounts for 90% of total ATP [34]. The position of the ion in coordination with β - and γ -phosphate oxygen atoms protects the nucleotide from hydrolysis. This fundamental role of the magnesium in binding sites is achieved through a hexacoordination under an octahedral geometry.

Our results show noticeable disparities with previously published work concerning the ATP binding site. A major difference concerns H1069 residue that has been shown to bind directly ATP without considering the role of the magnesium ion [11,16]. H1069 residue has been proposed to participate directly in ATP binding since the H1069Q mutation occurs frequently in WD. Its participation in ATP binding is not obvious and has to be reconsidered for both modeling and binding experiments. Indeed, the distance between ATP and H1069 is about 9–10 Å for the WT-Mg-ATP system that is not compatible with a direct participation of the histidine in the binding site. Similarly, the simulation of WT-ATP model reveals a distance between ATP molecule and H1069 about 17 Å (distance in the representative structure) that indicates no direct participation in the ATP vicinity. Experiments confirmed this conclusion. The binding measurement repeated eight times for the H1069Q mutant is not different from the WT protein in both magnesium free and bound conditions (Table 1). Previous experimental results suggest a perturbation of ATP binding with a decrease in ATP affinity even though results are not reproducible. The first experimental measurement for the H1069Q mutant performed by isothermal titration calorimetry reported a substantial decrease in ATP binding affinity (K_d was estimated around 1200 μ M) [17]. No alteration of the protein folding was reported. Then, Rodriguez-Granillo *et al.* obtained with the same method different results for the H1069Q mutation with only a two-fold decrease in affinity (K_d increase) as compared to the WT-ATP (344 μ M for H1069Q and 166 μ M for the WT) [16]. Moreover, the role of the magnesium ion was not considered in the binding experiments for the mutant. Such contradictory results leave the question amid controversy concerning the direct participation of the H1069 residue to the nucleotide binding. Another hypothesis has been proposed to explain the impact of the H1069Q mutation on the protein function. It was reported a total loss of phosphorylation of the conserved catalytic aspartic acid residue located in the P-domain [35]. This was observed without any alterations of the folding. This result is in agreement with the present work where the H1069 is far from the nucleotide-binding site and located close to the N-/P-domains interface. Similarly, Kenney and Cox reported that H1069Q mutation impacts on membrane expression due to the accumulation of the protein in the Golgi apparatus or in the endoplasmic reticulum [4]. All the above observations reinforce our findings.

Based on these fundamental data combined with *in silico* and structural biology techniques, we succeeded to clearly define the Mg^{2+} -ATP N-domain binding site. Mg^{2+} -ATP binding stabilizes the N-domain and reduces its internal atomic motions, particularly for the poly-glycine loop, the dynamic loop region and the N-terminal extremity of the protein. This latter observation remains to be clarified. This terminal part in our models evolves freely,

whilst in the structural context of the whole ATP7B protein, it is buried and connects the N- and P-domains. The N-terminal extremity moves towards the nucleotide and close to the glycine-rich loop. That is not the case in the nucleotide free simulation of the WT system. The flexibility of this region had already been incriminated in different structural studies as responsible for the rotation of the N-domain towards the P-domain, a necessary conformational change in the phosphorylation step of the catalytic cycle of these enzymes [36,37]. In addition, in the full protein, this N-terminal extremity bears the “DKTG” consensus motif of the P-ATPases suggesting that a possible local conformational change could regulate the catalytic activity of the enzyme. Let us bear in mind that all above conclusions are made on 3D models using the N-domain as a template. It would be interesting to study the impact of the nucleotide effect and the role of the long “dynamic loop” on the protein motions on the whole N-/P-domains.

We have also shown that shortening the dynamic loop results in a perturbation of ATP binding such as an alteration of the interactions in the Mg^{2+} environment. Indeed, the octahedral Mg^{2+} coordination is modified with the removal of D1167 residue, which is replaced by a water molecule (Figure 4A). This modification could be due to the perturbation of the α_3/α_4 helices. The presence of the loop only in ATP7B among all the ATPase protein family suggests an original participation of this loop to the allosteric regulation of ATP binding. Indeed, it could be argued that the reduction of this loop motions could facilitate phosphorylation of the ATP7B P-domain by inducing a decrease in the Mg^{2+} -ATP binding force to the N-domain. Moreover, a possible unknown protein partner could interact with the loop protruding in the cytosol, out of the Golgi membrane (Figure 4B). All the above data open up a new way for additional experimental investigations for characterizing this putative dynamic loop partner. It could be an unknown protein or another domain of the ATP7B protein. Indeed, a direct interaction between the complex formed by association of the N- and the P-domains and the N-terminal Copper-Binding Domain has been demonstrated [38].

In summary, we provided a clear definition of the topology and localization of the Mg^{2+} -ATP binding site by using a careful *in silico* protocol. Through the N-domain protein, the “DDE” motif (E1152, D1167, D1171) is able to coordinate the ion via an octahedral geometry (Figure 2). The absence of the Mg^{2+} ion led to a topology description of a transitory binding mode that could play an important role before the phosphorylation of the P-domain. Computational results such as the intervention of the ion or the role of the dynamic loop have been confirmed experimentally. The binding measurements have shown that the nucleotide is able to bind the N-domain with a submicromolar affinity in presence of Mg^{2+} ion. Most of all, the possible allosteric role by the long dynamic loop in the N-domain Mg^{2+} -ATP binding/release was put forward. All above results pave the road for additional investigations of the impact of mutations on the folding and function of the N-domain.

Methods

Structural analysis of Mg^{2+} -nucleotide binding site

In order to find the ATP7B N-domain Mg^{2+} -ATP binding site, a database search was done on the MSD motif database of the European Bioinformatics Institute [39]. It contains 19 042 different bonds interacting between amino acids and Mg^{2+} ion. The results are ranked for every amino acid participating to Mg^{2+} coordination in a decreasing order of occurrence probability (Figure S1). Then, based on this classification, a pharmacophore-

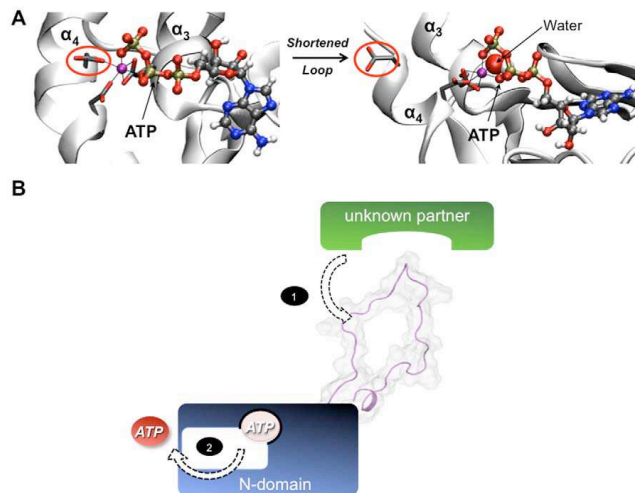


Figure 4. Implication of the flexible loop in ATP binding. (A) Closest trajectory snapshot of the representative structure for the whole and shortened N-domain (cartoon representation) for the WT-Mg-ATP (left) and SL-Mg-ATP (right) systems. The amino acid D1167 is circled in red and side-chains of the “DDE” motif are presented in sticks. ATP and water molecules are shown in ball and stick and VdW, respectively. (B) Schematic proposition of allosteric mechanism promoted by the dynamic loop for the nucleotide release process. The first step of the dynamic response of the loop implies a constraint applied by an unknown partner. The second step is the perturbation of the binding of ATP with the N-domain.
doi:10.1371/journal.pone.0026245.g004

based approach [39] is used to find a putative magnesium-binding site in the N-domain of ATP7B. The 3D structure of the N-domain is inserted on 3D grid of points with 1 Å between each point. Its surface is then mapped using a pharmacophore of an ideal Mg^{2+} coordination geometry (Figure S2). Each pharmacophoric point was designed according to functional chemical groups of the amino acid side-chains involved in the Mg^{2+} ion coordination. As an example of the most represented coordinating residues, it contains different pharmacophoric points (Asp, Glu, etc.). The definition of pharmacophoric points includes a sphere centered on Mg^{2+} with C_z atoms bearing active points. The sphere radius is adjusted depending on the volume of every atom of the side-chains (Asp, Glu, etc.), the number of residues to be included and their relative orientation. The 6 Å diameter of the sphere takes into account the volume of the spheres for the oxygen atoms and Mg^{2+} based on their respective Van der Waals radii (1.52 Å and 1.71 Å). This is compatible with the fact that experimental Mg^{2+} -O distance is rarely superior to 3 Å. The mapping procedure was repeated several times by varying systematically the nature of each pharmacophoric point and by respecting the occurrence probability of each amino acid obtained by the previous ranking procedure with an emphasis on acidic residues.

The validation of the Mg^{2+} nucleotide coordination site was achieved by performing a careful 3D visual analysis of 3D structures containing magnesium, ATP or analogues available in the Protein Data Bank (PDB). First, 72 proteins containing a nucleoside triphosphate hydrolase P-loop structural motif were studied (SCOP classification [40]). Next, the analysis was extended to 97 proteins bearing a Rossmann fold (CATH classification [41]). Finally, we expanded our PDB “scan” to 314 matching structures sharing the same nucleotide binding function as the N-domain (Gene Ontology term 166). Every nucleotide-binding pattern was

carefully analyzed with the help of PyMOL visualization program [42].

Molecular dynamics simulations

The NMR “model 1” structure of the N-domain of the ATP7B protein (PDB code 2ARF) was used as a starting structure for molecular dynamics (MD) simulations with the help of the GROMACS molecular dynamics package [43]. The WT and shortened N-domain (Shortened Loop: SL) isolated species as well as complexed with either ATP (WT-ATP) or Mg^{2+} -ATP (WT-Mg-ATP) were simulated. The initial position of the nucleotide was obtained from molecular docking using the WT model obtained from MD with the magnesium ion positioned near the “DDE” motif. Conformational space for ATP positioning was performed taking into account the residues highlighted from experimental and structural informations (Table S1). Then, calculations were done using AUTODOCK 4.2 [44]. 200 docking runs with Lamarckian Genetic Algorithm as a conformational search engine were done and results were clustered with a RMSD tolerance of 2 Å. The lowest energy conformation of the most populated cluster was then considered for following MD simulations.

All studied systems were prepared using Ambertools package [45]. The protein and the magnesium ion (Mg^{2+}) were described with the FF03 force field for proteins [46,47]. ATP parameters were obtained from GAFF force field [48] and additional revised parameters [49,50]. Topology and coordinates files obtained from tLEaP were then converted to GROMACS file format using AcPyype [51] python tool based. Each model was solvated in a rectangular water box with a 12 Å layer of TIP3P water molecules. The protein residues were considered at neutral pH. Thus, HIS residues were kept in the default neutral protonation state (HID, with hydrogen on the delta nitrogen) in Amber FF03.

Electro neutrality was achieved through the addition of the appropriate number of Na^+ counter ions. Energy minimization protocol included 5000 cycles of Steepest Descent algorithm with convergence criteria of $500 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$. The electrostatic non-bonded interactions were computed with a 12 \AA cut-off and particle-mesh Ewald method [52] to treat long range interactions. Lennard-Jones potential was described with a continuously smoothing cut-off from 10 to 12 \AA . A constant temperature/pressure simulation with a 1 fs time step under leap-frog algorithm for integrating Newton's equations of motion was performed. A total of 50 ns simulations were done for each system at 310 K in the NPT ensemble (constant number of particles, pressure, and temperature) with temperature velocity rescaling coupling [53] and at 1 atm pressure with Berendsen isotropic coupling [54]. The study of the impact of the large dynamic loop (residues A1114 to T1143) on the N-domain/ Mg^{2+} -ATP complex was investigated by shortening the loop (lacking residues 1121–1137) and by linking residues 1120 and 1138 to give SL-Mg-ATP system. The geometrical quality of the different representative 3D structures throughout the simulations was assessed by Ramachandran plots generated by the PROCHECK program [55] (Figure S5). For protein-ligand interactions studies and other analyses, representative structures were extracted using the closest frame from the representative structure over the last 20 ns of each trajectory. Hydrogen bonds have been considered with precise geometrical parameters: 3.2 \AA donor-acceptor distance cutoff and a 30° angle cutoff.

Protein expression and purification

To analyze the pertinence of the Mg^{2+} -ATP binding site, functional profiles of engineered N-domains of ATP7B (amino acid residues V1036-D1196 of the full-length protein) were determined. The corresponding cDNA region was PCR-amplified and subcloned as previously described [17]. Mutations were introduced using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene®) and verified by DNA sequencing (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Wild type or mutated cDNAs were then expressed and the corresponding proteins were purified. To avoid transcriptional bias, cell lines expressing comparable amounts of RNA from cDNA were selected by Taqman analysis.

Nucleotide binding experiments

Surface Plasmonic Resonance was used to determine the binding properties of WT and several mutants of N-domain with ATP and Mg^{2+} -ATP. The ATP7B/ATP and ATP7B/ATP, Mg^{2+} interactions were determined by surface plasmon resonance (SPR, BLAcore AB, Uppsala, Sweden) at 25°C using 10 mM sodium phosphate ($\text{pH } 7.40$) containing 150 mM NaCl as running buffer (phosphate-buffered saline, PBS). The flow rate was $5 \mu\text{L}/\text{min}$ during immobilization. Purified Wild Type and mutated ATP7B were covalently immobilized onto the hydrophilic carboxymethylated dextran matrix of the sensor chip CM4 previously activated with $35 \mu\text{L}$ activation solution, as described by the manufacturer. We used $10 \mu\text{L}$ (1 mM) of ATP or ATP + 12 mM MgCl_2 (Sigma) dissolved in 10 mM sodium acetate ($\text{pH } 5.00$). A reference surface was subjected to the same procedure, but with no protein. The chip was blocked using $35 \mu\text{L}$ of blocking solution (1 M ethanolamine hydrochloride, $\text{pH } 8.50$). We then injected the ATP or ATP+ Mg^{2+} solution and collected data at a flow rate of $30 \mu\text{L}/\text{min}$. Data were analyzed by nonlinear curve fitting using the manufacturer's software. Each binding experiment was repeated several times ($n = 6-8$) under both conditions.

Spectral characterization of theoretical models

The experimental validation of the generated 3D models was performed by comparison between the available NMR chemical shifts of the N-domain and "theoretical" chemical shifts calculated from MD trajectories. The various assigned experimental chemical shifts were extracted from the BioMagResBanK (entry number 6914). Apart from general NMR parameters such as relaxation times (T_1 , T_2), the chemical shifts are not available directly from simulation data. The SPARTA program [22] predicts protein backbone chemical shifts (^{15}N , $^1\text{H}^\text{N}$, $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^{13}\text{C}'$) from a PDB file. According to the elevated Pearson's correlation coefficient ($R = 0.91$) between experimental and SPARTA predicted chemical shifts calculated for $^{13}\text{C}_\alpha$ atoms, we decided to use these atoms to evaluate the correlation between experimental and calculated NMR shifts from our 3D models.

Supporting Information

Figure S1 Bar chart showing the proportion of the different amino acids involved in Mg^{2+} coordination (source EBI). The percentage of magnesium ion interacting with either an aspartic or a glutamic acid is shown. (DOC)

Figure S2 N-domain screening procedure used for identification of the Mg^{2+} binding coordination site. The N-domain is represented in cartoon, aspartic and glutamic acids side-chains in sticks. The pharmacophore presented here is an example of a fit obtained with Mg^{2+} and three amino acids (Asp, Asp, Glu). The result of the protein surface mapping is green circled and two important regions of the protein known to play a role in ATP binding are shown with black arrows (G1149-N1150, GxG motif). (DOC)

Figure S3 Examples of the Mg^{2+} coordination environment in different ATP-binding proteins: (A) Human nicotinamide riboside kinase, (B) yeast mitochondrial F1-ATPase, (C) GlcV, bacterial ABC-ATPase of the glucose ABC transporter, (D) ATPase domain of the bovine heat-shock cognate protein. Each 3D structure is identified with its PDB Id code. The ATP (or analogue) is colored in gray, the magnesium sphere in purple. (DOC)

Figure S4 Correlation plots between experimental and calculated NMR chemical shifts obtained from different structures for the $^{13}\text{C}_\alpha$ carbon atoms of the N-domain: (A) Initial structure available in the PDB, (B) Structure of the representative frame of the last 20 ns of 50 ns MD trajectories of the WT-Mg-ATP system and (C) of the WT system. Predictions of the chemical shifts were obtained using the SPARTA software (see Methods). (DOC)

Figure S5 Ramachandran plots of the N-domain monitoring the structural components of the models used throughout the molecular dynamics (MD) simulations. Initial structure after the minimization step (upper plot), structure of the representative frame of the last 20 ns of 50 ns MD trajectories for WT (left) and WT-Mg-ATP systems (right). The percentage of residues found in the most favorable regions of the diagram is indicated in a purple rectangle for each model. (DOC)

Figure S6 Geometrical details of the octahedral Mg^{2+} coordination in the nucleotide-binding site. The trajectory snapshot of the system WT-ATP-Mg represents atoms in close vicinity of the ion (magenta sphere). The representative structure of the last 20 ns of MD simulations is shown with the octahedral Mg^{2+} coordina-

tion in the nucleotide-binding site. The distances (Å) related to the octahedral coordination of the Mg^{2+} are the average values over the last 20 ns of the total dynamic simulation (50 ns). (DOC)

Figure S7 MD analysis and alternative binding mode of the N-domain in absence of Mg^{2+} for the WT-ATP system. (A) Plot of the Root Mean Square Deviation (RMSD, in Å) of the C_{α} atoms along the 50 ns of MD simulation for the WT-ATP system. (B) Closer trajectory snapshot of the representative structure along the last 20 ns of the 50 ns duration. Protein (WT), ATP molecule, and side-chain residues are represented in cartoon, ball and stick, and tube, respectively. Hydrogen bonds are shown in dotted line. (DOC)

Figure S8 MD analysis and binding mode of the N-domain where the dynamic loop (A1114-T1143) has been shortened for the SL-Mg-ATP system. (A) Plot of the Root Mean Square Deviation (RMSD, in Å) of the C_{α} atoms along the 50 ns of MD simulation for the SL-Mg-ATP system (red). (B) Closer trajectory snapshot of the representative structure along the last 20 ns of the

50 ns duration. Protein (shortened dynamic loop, SL), ATP and water molecules, magnesium atom and side-chain residues are represented in cartoon, ball and stick, VdW, and tube, respectively. Hydrogen bonds are shown in dotted line. (DOC)

Table S1 Structural and experimental information used to propose an initial binding site for ATP in the molecular dynamics simulations. The residues highlighted in yellow green belong to the glycine loop and light blue for the coordination helices. (DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CH PM. Analyzed the data: CH ND PC FW GB JML PM. Contributed reagents/materials/analysis tools: ND PC FW GB CB JML PM. Wrote the paper: CH JML PM. Performed the main experiments: CH ND. Contributed to additional experiments requested by referees: GB CB. Contributed to modification of the manuscript based on referees' suggestions: GB.

References

- Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 282–295.
- Gitlin JD (2003) Wilson disease. *Gastroenterology* 125: 1868–1877.
- Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML (2007) Wilson's disease. *The Lancet* 369: 397–408.
- Kennedy SM, Cox DW (2007) Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* 28: 1171–1177.
- Caca K, Ferenci P, Kühn H, Polli C, Willgerodt H, et al. (2001) High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *Journal of Hepatology* 35: 575–581.
- Kim EK, Yoo OJ, Song KY, Yoo HW, Choi SY, et al. (1998) Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 11: 275–278.
- Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, et al. (1993) The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 5: 344–350.
- Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U (2007) Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys* 463: 134–148.
- La Fontaine S, Mercer JF (2007) Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 463: 149–167.
- Hsi G, Cullen LM, Macintyre G, Chen MM, Glerum DM, et al. (2008) Sequence variation in the ATP-binding domain of the Wilson disease transporter, ATP7B, affects copper transport in a yeast model system. *Hum Mutat* 29: 491–501.
- Dmitriev O, Tsivkovskii R, Abildgaard F, Morgan CT, Markley JL, et al. (2006) Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5302–5307.
- Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, et al. (2006) Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5729–5734.
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Rosenzweig AC, Yatsunyk LA (2008) Metal binding domains 3 and 4 of the Wilson disease protein: solution structure and interaction with the copper(I) chaperone HAH1. *Biochemistry* 47: 7423–7429.
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Migliardi M, Natile G, et al. (2009) Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins. *Biochemistry* 48: 7849–7855.
- Efremov RG, Kosinsky YA, Nolde DE, Tsivkovskii R, Arseniev AS, et al. (2004) Molecular modelling of the nucleotide-binding domain of Wilson's disease protein: location of the ATP-binding site, domain dynamics and potential effects of the major disease mutations. *Biochem J* 382: 293–305.
- Rodríguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P (2008) Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *J Mol Biol* 383: 1097–1111.
- Morgan CT, Tsivkovskii R, Kosinsky YA, Efremov RG, Lutsenko S (2004) The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *J Biol Chem* 279: 36363–36371.
- Brankamp M, Altendorf K, Greie JC (2007) Common patterns and unique features of P-type ATPases: a comparative view on the KdpFABC complex from *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol* 24: 375–386.
- Horslen S, Hahn SH (2010) Genotype-phenotype correlation in Wilson disease. *J Clin Gastroenterol* 44: 387–388.
- Kubala M (2006) ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments. *Proteins* 64: 1–12.
- Okkeri J, Laakkonen L, Haltia T (2004) The nucleotide-binding domain of the Zn2+-transporting P-type ATPase from *Escherichia coli* carries a glycine motif that may be involved in binding of ATP. *Biochem J* 377: 95–105.
- Shen Y, Bax A (2007) Protein backbone chemical shifts predicted from searching a database for torsion angle and sequence homology. *J Biomol NMR* 38: 289–302.
- Dudev T, Lim C (2003) Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins. *Chem Rev* 103: 773–788.
- Linz R, Lutsenko S (2007) Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr* 39: 403–407.
- Tsivkovskii R, Eisses JF, Kaplan JH, Lutsenko S (2002) Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem* 277: 976–983.
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Inagaki S, Migliardi M, et al. (2010) The binding mode of ATP revealed by the solution structure of the N-domain of human ATP7A. *J Biol Chem* 285: 2537–2544.
- Toyoshima C, Mizutani T (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430: 529–535.
- Tsuda T, Toyoshima C (2009) Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase. *The EMBO Journal* 28: 1782–1791.
- Gourdon P, Liu X, Skjorringe T, Morth JP, Møller L, et al. (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* 475: 59–64.
- Patchornik G, Goldshleger R, Karlish SJ (2000) The complex ATP-Fe(2+) serves as a specific affinity cleavage reagent in ATP-Mg(2+) sites of Na,K-ATPase: altered ligation of Fe(2+) (Mg(2+)) ions accompanies the E(1)→E(2) conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11954–11959.
- Hua S, Inesi G, Nomura H, Toyoshima C (2002) Fe²⁺-catalyzed oxidation and cleavage of sarcoplasmic reticulum ATPase reveals Mg(2+) and Mg(2+)-ATP sites. *Biochemistry* 41: 11405–11410.
- Cowan JA (2002) Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biomolecules* 15: 225–235.
- Frausto da Silva JJR, Williams RJP (1991) The biological chemistry of magnesium: phosphate metabolism. The biological chemistry of the elements Oxford University Press. pp 250–277.
- Lüthi D, Günzel D, McGuigan JA (1999) Mg-ATP binding: its modification by spermine, the relevance to cytosolic Mg²⁺ buffering, changes in the intracellular ionized Mg²⁺ concentration and the estimation of Mg²⁺ by 31P-NMR. *Exp Physiol* 84: 231–252.
- Tsivkovskii R, Efremov RG, Lutsenko S (2003) The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B. *J Biol Chem* 278: 13302–13308.
- Sazinsky MH, Mandal A, Arguello J, Rosenzweig AC (2006) Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu⁺-ATPase. *J Biol Chem* 281: 11161–11166.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647–655.
- Tsivkovskii R, MacArthur BC, Lutsenko S (2001) The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the

- N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner. *J Biol Chem* 276: 2234–2242.
39. Golovin A, Henrick K (2008) MSDmotif: exploring protein sites and motifs. *BMC Bioinformatics* 9: 312.
 40. Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247: 536–540.
 41. Orengo CA, Michie AD, Jones S, Jones DT, Swindells MB, et al. (1997) CATH—a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* 5: 1093–1108.
 42. DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
 43. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* 4: 435–447.
 44. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30: 2785–2791.
 45. Case DA, Darden TA, Cheatham TE, III, Simmerling CL, Wang J, et al. (2010) AMBER 11 University of California, San Francisco.
 46. Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, et al. (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* 24: 1999–2012.
 47. Lee MC, Duan Y (2004) Distinguish protein decoys by using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model. *Proteins* 55: 620–634.
 48. Wang J, Wolf RM, Caldwell J, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* 25: 1157–1174.
 49. Amber website. Available: <http://www.pharmacy.manchester.ac.uk/bryce/amber>. Accessed 2011 October 03.
 50. Meagher KL, Redman LT, Carlson HA (2003) Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J Comput Chem* 24: 1016–1025.
 51. Nguyen TT, Mai BK, Li MS (2011) Study of Tamiflu Sensitivity to Variants of A/H5N1 Virus Using Different Force Fields. *J Chem Inf Model* 51: 2266–2276.
 52. Toukmalji A, Sagui C, Board J, Darden T (2000) Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *J Chem Phys* 113: 10913–10927.
 53. Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126: 014101–7.
 54. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690.
 55. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26: 283–291.

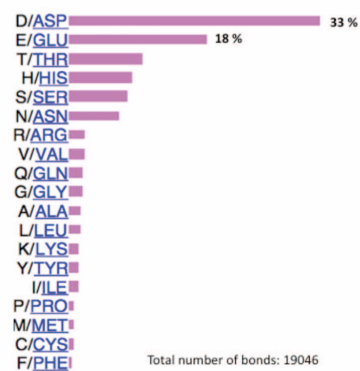


Figure S1. Bar chart showing the proportion of the different amino acids involved in Mg^{2+} coordination (source EBI). The percentage of magnesium ion interacting with either an aspartic or a glutamic acid is shown.

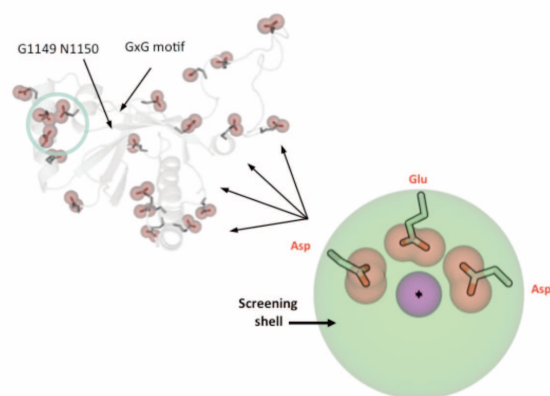


Figure S2. N-domain screening procedure used for identification of the Mg^{2+} binding coordination site. The N-domain is represented in cartoon, aspartic and glutamic acids side-chains in sticks. The pharmacophore presented here is an example of a fit obtained with Mg^{2+} and three amino acids (Asp, Asp, Glu). The result of the protein surface mapping is green circled and two important regions of the protein known to play a role in ATP binding are shown with black arrows (G1149-N1150, GxG motif).

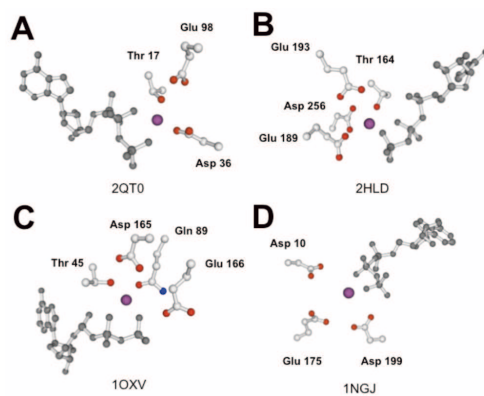


Figure S3. Examples of the Mg^{2+} coordination environment in different ATP-binding proteins: (A) Human nicotinamide riboside kinase, (B) yeast mitochondrial F1-ATPase, (C) GlcV, bacterial ABC-ATPase of the glucose ABC transporter, (D) ATPase domain of the bovine heat-shock cognate protein. Each 3D structure is identified with its PDB Id code. The ATP (or analogue) is colored in gray, the magnesium sphere in purple.

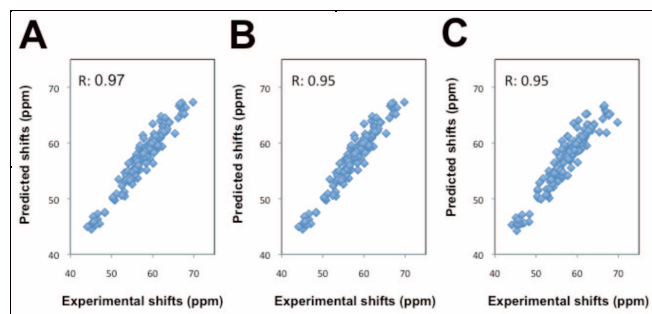


Figure S1. Correlation plots between experimental and calculated NMR chemical shifts obtained from different structures for the $^{13}\text{C}_\alpha$ carbon atoms of the N-domain: (A) Initial structure available in the PDB, (B) Structure of the representative frame of the last 20 ns of 50ns MD trajectories of the WT-Mg-ATP system and (C) of the WT system. Predictions of the chemical shifts were obtained using the SPARTA software (see Methods).

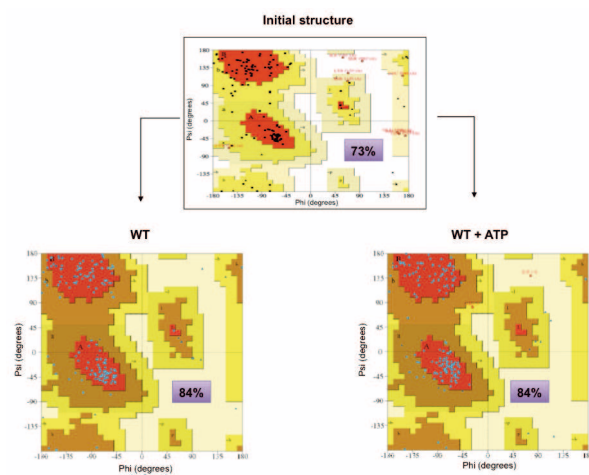


Figure S5. Ramachandran plots of the N-domain monitoring the structural components of the models used throughout the molecular dynamics (MD) simulations. Initial structure after the minimization step (upper plot), structure of the representative frame of the last 20 ns of 50 ns MD trajectories for WT (left) and WT-Mg-ATP systems (right). The percentage of residues found in the most favorable regions of the diagram is indicated in a purple rectangle for each model.

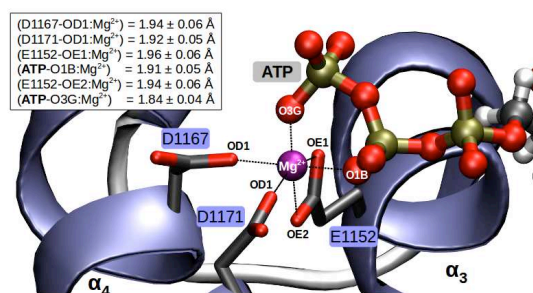


Figure S3. Geometrical details of the octahedral Mg^{2+} coordination in the nucleotide-binding site. The trajectory snapshot of the system WT-ATP-Mg represents atoms in close vicinity of the ion (magenta sphere). The representative structure of the last 20 ns of MD simulations is shown with the octahedral Mg^{2+} coordination in the nucleotide-binding site. The distances (Å) related to the octahedral coordination of the Mg^{2+} are the average values over the last 20 ns of the total dynamic simulation (50 ns).

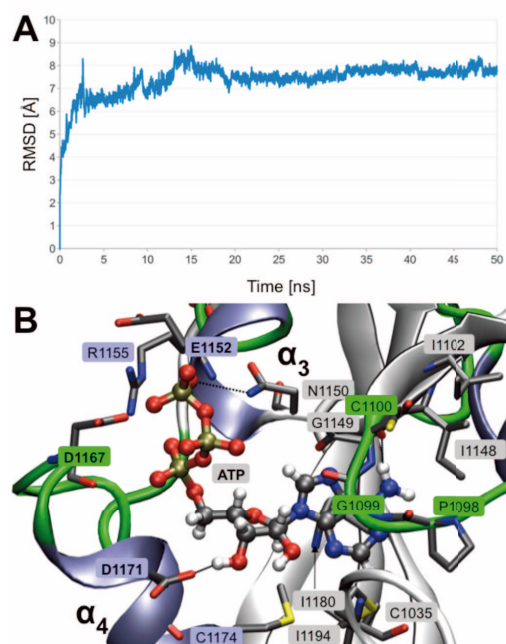


Figure S7. MD analysis and alternative binding mode of the N-domain in absence of Mg^{2+} for the WT-ATP system. (A) Plot of the Root Mean Square Deviation (RMSD, in Å) of the C_α atoms along the 50 ns of MD simulation for the WT-ATP system. (B) Closer trajectory snapshot of the representative structure along the last 20 ns of the 50 ns duration. Protein (WT), ATP molecule, and side-chain residues are represented in cartoon, ball and stick, and tube, respectively. Hydrogen bonds are shown in dotted line.

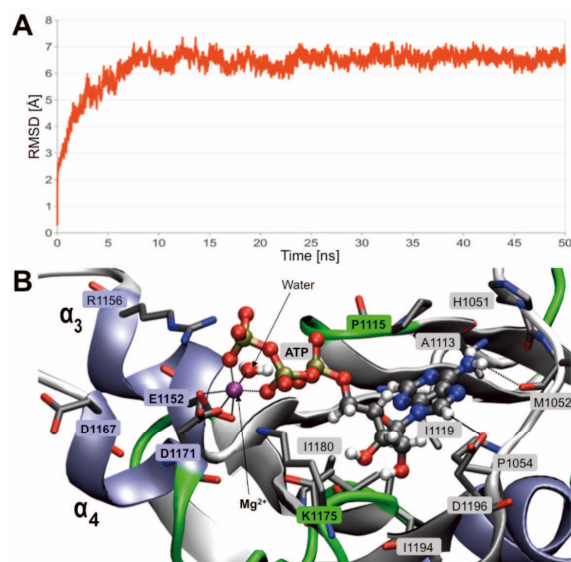


Figure S8. MD analysis and binding mode of the N-domain where the dynamic loop (A1114-T1143) has been shortened for the SL-Mg-ATP system. (A) Plot of the Root Mean Square Deviation (RMSD, in Å) of the C α atoms along the 50 ns of MD simulation for the SL-Mg-ATP system (red). (B) Closer trajectory snapshot of the representative structure along the last 20 ns of the 50 ns duration. Protein (shortened dynamic loop, SL), ATP and water molecules, magnesium atom and side-chain residues are represented in cartoon, ball and stick, VdW, and tube, respectively. Hydrogen bonds are shown in dotted line.

Residue	N-domain localization	ATP interaction	Origin	Reference
G1099	glycine loop	ribose	$\Delta\delta_{\text{ATP}}$ (NMR chemical shift)	11
G1101	glycine loop	adenine	$\Delta\delta_{\text{ATP}}$ (NMR chemical shift)	11
G1149	-	adenine	NOE restraint	11
N1150	-	ribose	NOE restraint	11
E1152	coordination helices	phosphate	pharmacophore screening	this study
D1167	coordination helices	phosphate	pharmacophore screening	this study
D1171	coordination helices	phosphate	pharmacophore screening	this study

Table S1. Structural and experimental information used to propose an initial binding site for ATP in the molecular dynamics simulations. The residues highlighted in yellow green belong to the glycine loop and light blue for the coordination helices.

4.3. Résultats

Les résultats publiés dans l'Article I mettent en évidence :

(i) l'existence d'un site de liaison au niveau du domaine N pour le complexe Mg^{2+} -ATP composé par une triade d'AA chargés négativement : E1152, D1167, D1171. La coordination est réalisée par la formation d'un complexe de géométrie octaédrique entre l'ion, l'ATP et les résidus de l'ATP7B. Ce site de liaison, situé au voisinage d'une cavité hydrophobe, est en accord avec les données structurales déjà publiées (Dmitriev *et al.*, 2006).

(ii) le rôle prépondérant joué par l'ion Mg^{2+} dans la coordination entre le nucléotide et le domaine N. L'augmentation de l'affinité observée expérimentalement en présence de l'ion confirme les résultats obtenus en modélisation.

(iii) une stabilisation observée dans plusieurs régions de la protéine en présence du complexe Mg-ATP sur la dynamique du domaine N. La coordination est stable comme le montre l'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire.

(iv) la perturbation de la coordination du complexe Mg-ATP lors de la « délétion » d'une grande partie de la boucle A1114-T1143. Les résultats obtenus pour le modèle 3D « tronqué » sont ainsi confirmés par l'absence de liaison observée expérimentalement dans les mêmes conditions.

(v) l'absence de participation du résidu H1069 dans le site de coordination du nucléotide. Les mesures d'affinités réalisées pour le mutant H1069Q ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus pour la protéine WT.

Ces résultats ont pu être obtenus par une analyse structurale rigoureuse de sites de liaisons protéique contenant un ion Mg^{2+} (motifs, nombre et nature des coordinants). Concernant les résultats de modélisation moléculaire, 4 modèles 3D ont été réalisés pour l'étude de la liaison à l'ATP à partir du WT en présence d'ATP : WT, WT-ATP, WT- Mg^{2+} -ATP, SL-Mg-ATP (pour plus de détails se référer à la partie Méthodes de l'article). Les mesures d'affinité réalisées pour le WT et différents mutants en présence d'ATP ou de Mg^{2+} -ATP ont été obtenues par résonance plasmonique de surface.

4.4. Discussion et Perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette étude fournissent de nouveaux éléments qui permettent de comprendre une des étapes essentielles dans le cycle de ces transporteurs passionnants que sont les ATPases à cuivre. En effet, la plupart des études se sont surtout focalisées sur le processus de phosphorylation (Tsivkovskii *et al.*, 2002) et sur le rôle général de l'ATP (Kubala, 2006). Différentes études de modélisation moléculaire ont été réalisées sur l'ATP7B. La première étude disponible était antérieure à la publication de la structure du domaine N en 2006. Les résultats obtenus à l'époque - basés sur l'interprétation d'un modèle 3D obtenu en utilisant la structure de la SERCA comme « template » initial - n'ont pas permis d'obtenir d'avancée notable (Dmitriev *et al.*, 2006). Une des raisons étant la faible homologie de séquence entre cette protéine et l'ATP7B au niveau du domaine N (moins de 20 %) mais aussi la proposition de deux sites putatifs de liaison pour l'ATP sans présence de Mg^{2+} . De nouvelles structures de protéines homologues de l'ATP7B ont été publiées depuis, même si les études utilisant la dynamique moléculaire sont rares (Rodriguez-Granillo *et al.*, 2008). La structure du domaine N de l'ATP7A a été « résolue » avec et sans ATP (Banci *et al.*, 2010). Même si le magnésium n'est pas présent dans la structure, l'organisation du domaine est semblable à celle du domaine N. La topologie du site de liaison diffère notamment pour la coordination du groupement phosphate de l'ATP. Il est intéressant de noter cependant que des résidus clés que nous avons décrit pour le domaine N sont conservés pour les deux protéines : P1098 (P1087 pour l'ATP7A), G1099 (G1116), G1101 (G1118), N1150 (N1184), E1157 (E1186), D1167 (D1201), et D1171 (D1205). L'absence de magnésium dans cette structure récente pourrait expliquer les différences observées entre les deux sites de liaison. Cette question a d'ailleurs été évoqué dans la publication structurale « princeps », qui évoquait l'existence de deux sites actifs (Dmitriev *et al.*, 2006).

Deux modèles 3D ont été réalisés pour le domaine N en présence ou absence de magnésium pour tenter d'approfondir cette première hypothèse, l'idée étant que l'ion magnésium pourrait permettre la transition entre les deux sites de liaison. Les résultats obtenus suggèrent que l'ion serait la clé de voute du premier site actif où le nucléotide est solidement ancré au domaine N à travers les phosphates du nucléotide. Le retrait de l'ion permettrait ensuite au nucléotide d'entrer plus en profondeur dans le domaine N après la rupture des interactions entre l'ion Mg^{2+} et les atomes d'oxygène β - γ des

groupements phosphates (ATP). Pour rappel, le nucléotide doit rentrer en contact avec le domaine P - avec l'acide aspartique D1027 notamment - pour permettre la phosphorylation du domaine P.

A l'heure actuelle, notre modèle 3D ne permet pas de rendre compte de l'étape de phosphorylation ni de la migration de l'ATP du domaine N au domaine P. Pourtant, les résultats préliminaires obtenus sont en accord avec les données structurales obtenues pour d'autres P-ATPases. Pour la SERCA, la présence du magnésium est constatée pour différentes structures contenant de l'ATP ou un autre analogue (Toyoshima *et al.*, 2004). Une structure récente du domaine N et P de la protéine CopA - homologue bactérien de l'ATP7B - obtenue avec un analogue de l'ATP donne quelques nouveaux éléments qui vont dans le même sens (Tsuda *et al.*, 2009) : le nucléotide est situé à l'interface des domaines N/P et est hexacoordonné avec l'ion Mg^{2+} .

Il est intéressant de noter que les résidus DDE de l'ATP7B ne sont pas présents chez la CopA. Cet élément doit être gardé à l'esprit lorsqu'on extrapole les résultats concernant les différentes protéines mais surtout il sous-tend peut être une différence qui existerait dans le mode de liaison entre les P-ATPases à cuivre humaines et bactériennes. L'existence d'une longue boucle présente uniquement chez l'ATP7B (A1114-T1143) est, pour les mêmes raisons, d'une grande importance. A ce titre, il serait justement intéressant de réaliser une étude en dynamique moléculaire avec les différentes structures disponibles pour la CopA afin de pouvoir comparer avec les résultats obtenus pour l'ATP7B.

Un autre résultat qui entre les études structurales réalisées sur le domaine N, concerne le rôle du magnésium dans la liaison avec le nucléotide. Il ressort des analyses structurales réalisées au cours de cette étude que la présence du magnésium est nécessaire pour coordonner les résidus chargés négativement de la triade DDE du domaine N avec les groupements phosphates de l'ATP chargés négativement. Le magnésium est parfait dans ce rôle car il permet peut être d'accroître indirectement la force de l'interaction entre l'ATP et le domaine N. En outre, il permettrait peut être comme déjà évoqué précédemment, de favoriser la migration vers un site de « liaison transitoire » puis vers le domaine P.

Les résultats expérimentaux déjà publiés viennent corroborer les résultats de modélisation. La diminution du K_d mesurée pour différents ligands avec le domaine N observée en présence du magnésium a été mise en évidence par l'équipe de Morgan *et*

al., : 75,30 μM ($\pm 3,62$) pour l'ATP seul et 57 μM ($\pm 3,00$) complexe Mg^{2+} -ATP (Morgan *et al.*, 2004). Il a été conclu de manière surprenante que la fixation de l'ATP est un évènement indépendant du magnésium dans la mesure où l'ion Mg^{2+} seul n'a pas d'affinité pour le domaine N. Comment dans ce cas comprendre le fait que l'AMP ou l'ADP ait plus d'affinité que l'ATP pour la protéine sauvage alors que l'ajout de Mg^{2+} en présence d'ATP permet d'obtenir la plus grande affinité avec le domaine N ? Cette différence d'affinité ainsi que l'effet du magnésium mesuré pour la protéine sauvage n'ont pas été confirmés pour les mutants. Malgré cela, cette étude est systématiquement invoquée pour justifier l'absence de participation du magnésium, alors que le magnésium est nécessaire à la phosphorylation de la protéine (Tsivkovskii *et al.*, 2002). Les conclusions concernant l'absence de rôle du magnésium dans la fixation à l'ATP7B s'apparentent aux résultats obtenus précédemment pour les autres P-ATPases. L'explication fournie pour expliquer comment l'ATP interagirait seul avec le domaine N, pour se retrouver lié au magnésium au moment de la phosphorylation dépend des auteurs. Une des explications avancées, parmi d'autres, est la formation d'un complexe labile entre le magnésium et l'ATP, qui se dissocierait pour se former à nouveau, au moment où le nucléotide serait suffisamment proche du site de phosphorylation, l'association du magnésium et du nucléotide ayant lieu de manière aléatoire (Reinstein *et al.*, 1993). Deux études réalisées sur d'autres P-ATPases viennent pourtant renforcer notre hypothèse. Un protocole original permettant de remplacer l'ion Mg^{2+} par l'ion Fe^{2+} a été utilisé pour étudier le site de liaison de la Na^+ - K^+ -ATPase. Une interaction directe entre le complexe ATP- Fe^{2+} et des résidus - acides aspartiques - chargés négativement du motif VAGDA du domaine N a été démontrée (Patchornik *et al.*, 2000). Peu de temps après, l'équipe dirigée par Toyoshima, a publié des résultats similaires pour la SERCA montrant une interaction entre le Mg^{2+} -ATP et le domaine N (Hua *et al.*, 2002). Plus généralement, l'ion Mg^{2+} est le cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques faisant intervenir des nucléotides (kinases, protéines G, polymérases, voir pour revue Cowan, 2002). Il va permettre de diminuer la répulsion électrostatique entre le nucléotide et des partenaires réactionnels chargés négativement (ADN, site catalytique de phosphorylation, cofacteur enzymatique). De plus, la concentration importante de Mg^{2+} ($\approx 10^{-3} \text{ M}$) explique pourquoi l'ATP est majoritairement sous forme de complexe Mg^{2+} -ATP - le complexe est relativement stable avec une constante d'affinité $K_a \approx 10^4 \text{ M}$ -

dans la cellule (Frausto da Silva *et al.*, 1991). Ce résultat est confirmé sur des tissus musculaires où le complexe représente 90 % de l'ATP total (Lüthi *et al.*, 1999).

Un des résultats originaux de l'étude de modélisation concerne le résidu H1069. Pour mémoire, la mutation H1069Q est importante dans le diagnostic de la maladie de Wilson puisqu'elle est retrouvée chez plus de 30 % des patients. Le résidu H1069 a été proposé comme un des résidus clés d'interaction avec l'ATP. Or, les résultats publiés dans l'article I ne vont pas dans ce sens. En effet, dans les différentes simulations (WT-Mg-ATP, WT-ATP) la distance entre l'ATP et le résidu H1069 – distance supérieure à 10 Å – n'est pas compatible avec une interaction directe. De même, les résultats d'affinité obtenus ne sont pas significativement différents entre le WT et le mutant H1069Q.

A l'opposé, les résultats expérimentaux déjà publiés pour ce mutant ne sont pas reproductibles. L'équipe de S. Lustenko a obtenu une diminution de l'affinité de l'ATP pour le mutant H1069Q, le K_d estimé était de 1200 μ M (Morgan *et al.*, 2004). Plus tard, Rodriguez-Granillo *et al.*, (2008) publient avec la même technique une diminution de l'affinité mais nettement moins importante (K_d : 344 μ M pour H1069Q et 166 μ M pour le WT). La mesure en présence de magnésium n'a été effectuée pour aucune de ces deux études. La question reste donc ouverte quant au rôle de ce résidu dans la liaison avec l'ATP.

D'autant que d'autres perturbations de la fonction de l'ATP7B ont été rapportées pour ce mutant. Au niveau du domaine P, il y a une diminution importante de la phosphorylation de l'acide aspartique conservé (Tsivkovskii *et al.*, 2003) sans que le folding soit affecté. Ce résultat est compatible avec la présence du résidu à proximité de l'interface du domaine N et P. Parallèlement, l'équipe de D.W. Cox a montré que la mutation H1069Q entraîne des dysfonctionnements dans le cycle cellulaire de la protéine, la protéine mutante s'accumulant au niveau du trans-Golgi ou du reticulum endoplasmique (Kenney *et al.*, 2007). Ces résultats renforcent notre conclusion préliminaire. Un modèle 3D du domaine N-P permettrait sûrement d'en apprendre plus concernant ce mutant pour réaliser une étude dynamique. En effet, la structure du mutant équivalent chez la CopA (H462Q) ne montre que des différences minimales concernant la liaison à l'ATP (Tsuda *et al.*, 2009).

Enfin, une des originalités de l'étude est basée sur la proposition d'un rôle inédit pour la boucle A1114-T1143, boucle qui est présente seulement chez les ATPases à cuivre humaine (ATP7B et ATP7A). Le raccourcissement de la boucle produit une modification

dans la dynamique du site actif aboutissant au remplacement du résidu D1167 par une molécule d'eau à travers une perturbation des hélices portant le motif DDE. Expérimentalement, la liaison entre l'ATP et le domaine N est affectée comme le montre l'augmentation du K_d ($> 1\text{mM}$). Ainsi, elle pourrait avoir un rôle allostérique en favorisant *in fine* l'expulsion de l'ATP vers le domaine P par la diminution de la force d'interaction entre le complexe Mg^{2+} -ATP et le domaine N. La question d'un éventuel partenaire protéique capable d'interagir avec la boucle se pose. Il pourrait même s'agir d'un des DLC de l'ATP7B. L'interaction entre les domaines de liaison au cuivre situé dans la partie N-terminale et le DLA a d'ailleurs été montrée (Tsivkovskii *et al.*, 2001).

Les données préliminaires apportées par ce travail pourraient être enrichies dans les années à venir. En effet, un nombre croissant de données structurales ont été publiées pour l'ATP7B depuis celles portant sur le domaine N : DLC 5 et 6 (Achila *et al.*, 2006), DLC 3 et 4 (Banci *et al.*, 2008), domaine A (Banci *et al.*, 2009). Récemment, la publication d'une structure quasi complète de la CopA - les 2 DLC n'ont pas pu être résolus - va permettre de résoudre les différentes questions posées par le mouvement des domaines N et P et les interactions avec les domaines membranaires qui ont été peu étudiées chez les P-ATPase de type Ib (Gourdon *et al.*, 2011).

La prochaine étape de ce travail va consister à réaliser les modèles 3D des différents mutants afin de pouvoir interpréter l'impact des différentes mutations connues ou non publiées du domaine N (H1069Q, E1064A, etc...). A celles-ci viendront s'ajouter les nouvelles mutations mises en évidence dans le service par le Dr Chappuis. Ces études nécessiteront de nouvelles données biologiques pour permettre à la modélisation d'interpréter l'impact des mutations. Après le test de complémentation sur levure, l'obtention d'hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites est une des techniques les plus prometteuses pour l'étude de l'ATP7B. En effet, une équipe de chercheurs chinois a obtenu des hépatocytes différenciés à partir d'un prélèvement de fibroblastes d'un patient portant la mutation R778L - mutation prépondérante dans les populations asiatiques - et a réussi à restituer certaines des anomalies de distribution cellulaires de l'ATP7B déjà décrites (Zhang *et al.*, 2011). Ce modèle est particulièrement intéressant dans la mesure où il permet de suivre le devenir de la protéine au cours de la différenciation cellulaire et ouvre ainsi de nouvelles perspectives à côté des études biochimiques classiques.

En terme de modélisation, les nombreuses structures disponibles vont permettre de réaliser un modèle 3D du DLA (domaine N+P) de l'ATP7B, le modèle 3D du domaine P pouvant être obtenu en réalisant par exemple une modélisation par homologie à partir de celui de la CopA.

5. Conclusion

L'étude réalisée grâce aux outils de modélisation moléculaire a permis de résoudre de nombreuses questions concernant la liaison du nucléotide au domaine N, étape essentielle du cycle catalytique de l'ATP7B. Par le biais de simulations de dynamique moléculaire, l'étude de la dynamique du complexe Mg^{2+} -ATP et du domaine N a été étudiée. Le rôle stabilisateur de l'ATP a ainsi été mis en évidence à travers la réalisation de plusieurs modèles 3D, modèles qui ont pu être validés expérimentalement. Le rôle de l'ion magnésium a été confirmé et a permis de proposer une hypothèse mécanistique concernant l'existence de deux sites de liaison pour l'ATP au sein du domaine N. De plus, un rôle a été proposé pour la longue boucle A1114-T1143 – motif original présent chez les P-ATPases à cuivre humaine - dans la régulation de la fixation du nucléotide.

Les résultats obtenus montrent comment la modélisation moléculaire permet à la fois une étude des propriétés à l'échelle atomique de la protéine mais aussi comment elle pourra servir d'outil diagnostique à travers la réalisation et l'étude des modèles 3D pour les mutants mis en évidence en génétique. Il reste à montrer comment cet outil va s'insérer dans la chaîne diagnostique de la maladie de Wilson.

Plus généralement, l'essor de la génétique *in silico*, à travers ce premier travail sur la maladie de Wilson, dépendra des résultats obtenus par la suite en sachant que la part la plus importante du travail a déjà été réalisée sur la protéine WT. Cette étape est essentielle dans la conception de cet outil comme une aide diagnostique pour le clinicien et permettra par la suite de montrer comment il pourra intervenir dans l'étape de prédiction de l'impact des mutations. Comme tous les outils disponibles en biologie clinique, les outils *in silico* devront se plier à des exigences de standardisation, de reproductibilité et de qualité. Ce n'est qu'à ce prix que la génétique *in silico* pourra obtenir une considération et une existence dans la routine hospitalière.

Chapitre III.

Etude du récepteur 5-HT_{2B} humain

III- Etude du récepteur humain 5-HT_{2B}

1. Introduction

La deuxième partie de mon travail de thèse concerne l'étude d'un récepteur important du système sérotoninergique : le récepteur 5-HT_{2B}. L'étude de modélisation réalisée pour ce travail de thèse poursuit les travaux réalisés au laboratoire qui ont permis de caractériser le site de liaison des agonistes et d'expliquer les différences pharmacologiques entre le récepteur humain et murin. Il s'agit de comprendre quelles fonctions peut avoir la partie extracellulaire N-terminale. Ceci au travers d'un polymorphisme, localisé dans la partie N-terminale, mis en évidence dans une cohorte de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire. L'origine médicamenteuse de cette pathologie sera particulièrement développé ainsi que la contribution du récepteur 5-HT_{2B}.

2. Le système sérotoninergique

2.1. La sérotonine

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) a été décrite la première fois, il y a plus de 70 ans par Erspamer pour ses propriétés de constricteur entérique (d'où son synonyme d'entéramine). A partir d'un extrait de muqueuse gastrique de lapin, il isole une substance qui provoque la contraction des muscles lisses, en particulier des muscles utérins (article qui fut publié originellement en italien, Vialli *et al.*, 1937). Quelques années plus tôt, les mêmes auteurs avaient montré la présence d'une amine dans les cellules « granuleuses » de la muqueuse gastrique (Vialli *et al.*, 1933), cellules découvertes au même moment par Erspamer sous le nom de cellules entérochromaffines.

Il faut attendre l'année 1948 avec les travaux de Rapport et Green pour voir la purification et la cristallisation d'une substance vasoconstrictrice qu'ils nomment sérotonine : *which indicates its source in serum and its activity is one of causing constriction* (Rapport *et al.*, 1948). L'origine du nom découle du mot latin *serum* du fait qu'elle fut isolée à partir du sang et du mot grec *tonic* pour ses capacités à contracter les muscles lisses. La présence et le rôle de la 5-HT comme neurotransmetteur au sein du

système nerveux central (SNC) des mammifères date du début des années 1950 (Twarog *et al.*, 1953). Il fut découvert un peu plus tard que sérotonine et entéramine étaient une seule et même substance.

De nombreuses études ont été publiées par la suite, retrouvant de la sérotonine dans d'autres tissus (poumon, rein, plaquettes et tractus gastro-intestinal), ce qui témoigne des rôles ubiquitaires de la 5-HT, de son transporteur et de ses récepteurs réunis au sein du signalosome sérotoninergique (pour revue voir Jonnakuty *et al.*, 2008).

2.1.1. Biosynthèse, stockage et libération de la 5-HT

Bien que de grandes quantités de 5-HT soient présentes dans l'alimentation, elle est en quasi-totalité catabolisée lors du passage de la barrière intestinale puis au niveau du foie et des poumons. La 5-HT présente dans l'organisme est donc synthétisée à partir du L-tryptophane (Trp) alimentaire dans la plupart des cellules riches en 5-HT (neurones, cellules entérochromaffines). Cette voie métabolique est mineure chez les mammifères (1 à 2% du Trp) par rapport à celles qui aboutit au NAD par la voie des cynurénines mais devient majoritaire dans les cas de tumeurs carcinoïdes (jusqu'à 60 %).

La tryptophane hydroxylase (TPH) va hydroxyler le Trp fourni par l'alimentation en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) à l'aide de cofacteurs comme l'oxygène moléculaire et la tétrahydrobioptérine (Figure 18). L'hydroxylation du Trp est l'étape limitante de la voie de biosynthèse de la sérotonine. La TPH a un K_m assez élevé pour le Trp (3.10^{-5} M). La biosynthèse de la 5-HT au niveau périphérique est assurée par l'isoforme 1 de la TPH (peau, glande pinéale, intestin). Dans les cellules neuronales au sein du SNC, c'est l'isoforme 2 qui est principalement exprimée. De fait, la TPH2 est la principale responsable du contrôle des taux de sérotonine dans le cerveau, une mutation sur le gène *TPH2* (P447R) entraîne une diminution du taux de sérotonine *in vitro* et *in vivo* (Zhang *et al.*, 2004).

Le 5-HTP est ensuite décarboxylé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC), également responsable de la décarboxylation de la L-DOPA en dopamine. L'AADC, enzyme ubiquitaire, a besoin d'au moins un groupement -SH et du phosphate pyridoxal comme cofacteur (pour revue Manivet P. *et al.*, 2012).

Une quantité de 5-HT à peu près équivalente à celle présente dans l'organisme est synthétisée chaque jour. Les temps de renouvellement (*turn over*) mesurés dans

différents tissus de lapin varient: plaquettes et rate 33-48h ; estomac 17h et intestin 11h. Concernant le cerveau, il s'agirait de l'ordre de quelques minutes (Udenfriend *et al.*, 1958). A l'opposé, le renouvellement de la 5-HT présente dans les mastocytes de rongeurs est très lent et la 5-HT plaquettaire ne semble être libérée que lors de la destruction des plaquettes (demi-vie chez l'homme de l'ordre de 7 à 10 jours) ou lors de la réaction de libération (« *release reaction* ») précédant l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine ou d'autres agents.

Au niveau du SNC, la 5-HT est stockée après sa synthèse dans des vésicules synaptiques par transport actif de type antiport (proton/5-HT) commun aux monoamines via le VMAT (Erickson *et al.*, 1992). Ce transporteur vésiculaire utilise le gradient électrochimique créé par une H⁺-ATPase pour faire entrer la 5-HT à l'intérieur des granules sécrétoires. Deux isoformes, VMAT1 et VMAT2 sont connus à ce jour. VMAT1 est exprimé principalement dans les cellules entérochromaffines et VMAT2 dans les neurones centraux et entériques ainsi que dans les plaquettes (Erickson *et al.*, 1996).

La 5-HT est ensuite libérée par exocytose à partir des neurones sérotoninergiques à la suite d'une dépolarisation membranaire. Au niveau périphérique, 90-95 % de la 5-HT est synthétisée à partir des cellules entérochromaffines de la paroi intestinale et stockée ensuite majoritairement dans les plaquettes sanguines au sein des granules denses avec ATP, calcium et magnésium (Tranzer *et al.*, 1966).

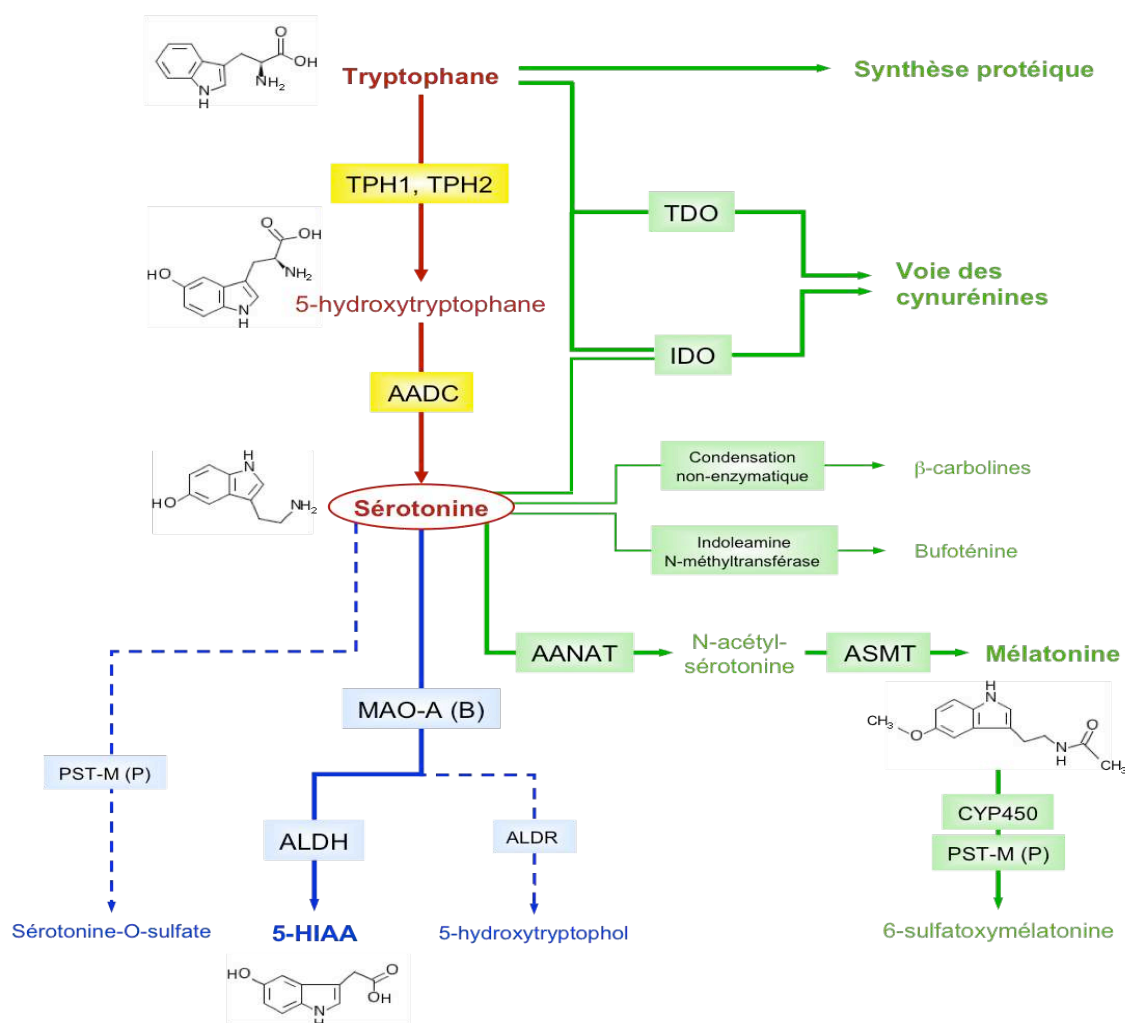


Figure 18. Schéma général de la biosynthèse et du catabolisme de la sérotonine. La voie de biosynthèse de la sérotonine à partir du tryptophane est indiquée en rouge, les principales voies cataboliques de la sérotonine en bleu. Les voies métaboliques communes sérotonine-tryptophane sont indiquées en vert. AADC : décarboxylase des acides aminés aromatiques, AANAT : arylalkylamine N-acétyl transférase, ALDH : aldéhyde deshydrogénase, ALDR : aldéhyde réductase, ASMT : acétylsérotonine méthyltransférase (= HIOMT : hydroxyindole O-méthyltransférase), CYP450 : cytochrome P450, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, MAO-A (B) : monoamine oxydase A (éventuellement B), PST-M (P) : phénolsulfotransférase M (éventuellement P), TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase, TPH : tryptophane hydroxylase (1 ou 2).

2.1.2. Inactivation de la 5-HT

La régulation fine des concentrations extracellulaires de 5-HT libérée après fixation sur ses cibles et conduisant à son inactivation, est réalisée par un mécanisme de recapture ou par dégradation(s) enzymatique(s).

2.1.2.1. Recapture de la sérotonine (transporteur)

Le mécanisme de la recapture de la 5-HT est un système de transport faisant intervenir une protéine membranaire spécifique, le transporteur de la sérotonine SERT (ou 5-

HTT). Le SERT diminue la concentration en 5-HT dans la fente synaptique où il réalise le transfert de l'amine de l'espace extracellulaire (ex : fente synaptique) vers le compartiment cytoplasmique (Figure 19). La 5-HT est ensuite dégradée ou recyclée dans les vésicules sécrétoires (vésicules synaptiques, granules denses des plaquettes sanguines). Codé par le gène *SLC6A4*, le SERT possède 12 domaines transmembranaires et appartient à la familles des transporteurs Na^+/Cl^- dépendants, de type SLC pour solute carrier.

Le transport par le SERT fait intervenir simultanément la 5-HT ainsi qu'un ion Na^+ et un ion Cl^- . La liaison depuis l'espace extracellulaire va entraîner un changement conformationnel d'un motif structural composé de 4 hélices qui va permettre par la suite la fermeture de la voie de passage extracellulaire et empêcher l'entrée de nouveaux ligands. Ce pivot permet d'exposer le site de liaison cytoplasmique. Ensuite la dissociation Na^+ , Cl^- et de 5-HT^+ (forme protonée) libère la place pour la fixation d'un ion K^+ (ou un proton) ; le SERT change à nouveau de conformation, aboutissant à la sortie de l'ion K^+ dans le milieu extracellulaire. Un nouveau cycle peut ainsi commencer. Le SERT possède des sites consensus de phosphorylation pour différentes protéines kinases (PKA, PKC, protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante, PKG). La phosphorylation est un élément essentiel dans la régulation du SERT. Elle provoque l'internalisation du récepteur, processus dans lequel le rôle du récepteur 5-HT_{2B} , dont nous reparlerons par la suite, est primordial (Launay *et al.*, 2006).

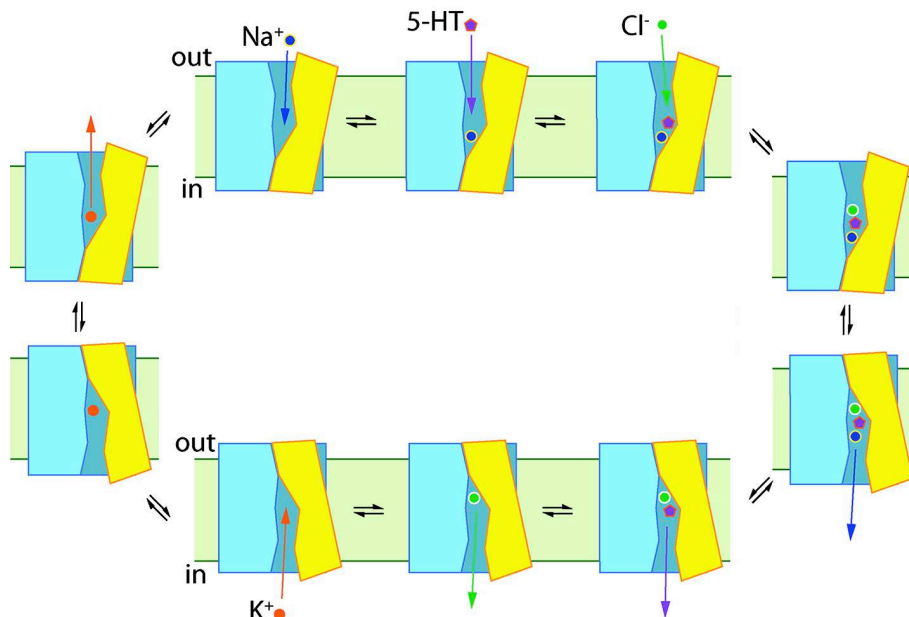


Figure 19. Mécanisme proposé de transport de la sérotonine par le SERT. (d'après Rudnick, 2011) Les hélices réalisant le changement conformationnel sont présentés en jaune, le reste du châssis moléculaire du SERT est coloré en bleu. Out : milieu extracellulaire. In : cytoplasme.

En terme de spécificité de substrat, le SERT est capable de transporter d'autres tryptamines mais aussi des composés psychostimulants comme le MDMA (ecstasy) amphétamine (ex : cocaïne) et des anorexigènes (ex : fenfluramine). En outre, il est la cible spécifique des antidépresseurs de type SSRI (ex : fluoxétine, paroxétine) mais aussi celle des antidépresseurs tricycliques (ex : imipramine). Ces molécules agissent directement sur le SERT en empêchant l'entrée de la 5-HT, aboutissant ainsi à augmenter sa concentration extracellulaire.

Le SERT est localisé dans le SNC au niveau de la membrane plasmiques des neurones sérotoninergiques, au niveau des corps cellulaires, dans les fibres et les terminaisons des noyaux du raphé. Il est également présent dans le cortex cérébral et certaines zones de l'hippocampe. Au niveau périphérique, le SERT est localisé principalement dans la membrane plasmique des plaquettes mais aussi dans de nombreux tissus (poumons, cœur, intestins) et types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, etc...).

2.1.2.2. Dégradation enzymatique

Le catabolite principal de la 5-HT est l'acide 5-hydroxy-indolyl-acétique (5-HIAA). Il est obtenu par dégradation enzymatique en deux étapes (Figure 18). La désamination oxydative est effectuée par les monoamine oxydases (MAO) qui transforment la 5-HT en 5-hydroxy-indole-acétaldéhyde puis survient l'oxydation de ce dernier en 5-HIAA par

une aldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'aldéhyde intermédiaire de ce catabolisme peut aussi être réduit par une aldéhyde réductase en 5-hydroxytryptophol.

Le dosage urinaire du 5-HIAA permet d'explorer la production de 5-HT. L'activité MAO requiert de l'oxygène moléculaire, du FAD, et des groupes -SH. Deux formes de MAO ont été mises en évidence : la MAO de type A dont les substrats préférentiels sont la 5-HT, la noradrénaline et l'adrénaline ; la MAO de type B qui désamine préférentiellement la dopamine, la β -phényléthylamine et la benzylamine.

La régulation des taux de 5-HT passe donc par les MAO. L'existence d'une régulation épigénétique de ces enzymes vient d'être démontré. La protéine SIRT1 est capable de réguler transcriptionnellement l'activité de la MAO-A (Libert *et al.*, 2011) : les souris invalidées génétiquement pour SIRT1 au niveau cérébral ont des taux de 5-HT (et de noradrénaline) diminués aboutissant à des changements comportementaux chez les souris (anxiété, comportement exploratoire).

Les premiers inhibiteurs de MAO étaient utilisés comme antidépresseur mais avaient de nombreux effets secondaires. Des inhibiteurs sélectifs et réversibles aujourd'hui disponibles sont utilisés comme une des thérapeutiques dans les dépressions sévères ou atypiques (pour revue voir Yamada *et al.*, 2004).

Au niveau de l'épiphyse ou glande pinéale, la 5-HT est convertie en mélatonine en deux étapes : acétylation du groupement amine primaire de la chaîne latérale par une N-acétyltransférase en N-acétyl-sérotonine et méthylation en position 5 par une méthyltransférase. La mélatonine est une neuro-hormone qui joue un rôle essentiel dans la régulation des rythmes chronobiologiques.

Les autres voies du métabolisme de la 5-HT comme la sulfoconjugaison ou des dégradations non enzymatiques ne seront pas détaillées ici (voir Manivet P. *et al.*, 2012).

2.1.3. Sites d'actions de la sérotonine

2.1.3.1. Rôle dans le SNC

Les sites d'actions de la 5-HT sont nombreux. La 5-HT participe en tant que neuromédiateur du SNC à de nombreuses fonctions physiologiques essentielles. Elle est impliquée dans le contrôle du cycle veille/sommeil, l'activité motrice, la prise alimentaire, les fonctions cognitives, la neurogénèse, la thermorégulation, les régulations endocrines et neurovégétatives au niveau respiratoire et cardiovasculaire. Certains dysfonctionnements du système sérotoninergique sont impliqués dans le

développement de troubles psychiatriques comme les troubles dépressifs ou anxieux, les troubles obsessionnels compulsifs, ceci à travers notamment la théorie monoaminergique de la dépression. La base du traitement passe par l'utilisation d'inhibiteur plus moins sélectif du SERT (SSRIs). Ces antidépresseurs ont un rôle qui dépasse l'augmentation de la 5-HT dans la fente synaptique (pour revue voir Baudry *et al.*, 2011). Des avancées notables sur la compréhension du mécanisme d'action ont été faite récemment. Le délai de latence concernant l'action des SSRI s'explique par le contrôle post-transcriptionnel du SERT via miR-16 sur les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Baudry *et al.*, 2010).

2.1.3.2. Rôle dans le tractus gastro-intestinal

Au niveau gastro-intestinal, la 5-HT qui est sécrétée par les neurones myentériques, intervient dans le péristaltisme intestinal en stimulant la motilité des cellules musculaires lisses. Elle régule la neurotransmission intestinale via les terminaisons afférentes de neurones sympathiques et parasympathiques qui forme le système nerveux entérique. Plus en amont, l'arrivée du bol alimentaire provoque une augmentation de la pression au niveau de la muqueuse intestinale qui provoque la sécrétion de 5-HT par les cellules entérochromaffines. La sérotonine a également un effet émétisant via les terminaisons vagues afférentes de l'intestin. Un dérèglement du système sérotoninergique a été observé par exemple, dans les vomissements post-chimiothérapie qui sont traités par des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ (sétrons). Au niveau entérocytaire, l'expression du SERT permet la recapture de la 5-HT, entraînant son élimination de l'espace interstitiel.

Un dysfonctionnement du système sérotoninergique a également été évoqué dans la physiopathologie des maladies inflammatoires du tube digestif et dans le syndrome du colon irritable, syndrome où alternent périodes de diarrhées et périodes de constipations associées à des douleurs abdominales chroniques. Des variations des taux plasmatiques de sérotonine en période post-prandiale ont d'ailleurs été observées. A ceci viendrait s'ajouter une diminution de la recapture de la 5-HT (pour revue voir Sikander *et al.*, 2009).

Les tumeurs carcinoïdes, qui ont pour cause la prolifération lente de cellules neuro-endocrines, font intervenir le système sérotoninergique. Elles sont localisées à 90 % dans le système gastro-intestinal. Les signes cliniques composés de troubles vasomoteurs, d'atteintes digestives (diarrhées) et cardiaques (valvulopathies droites)

sont provoqués par une hypersécrétion de 5-HT mais aussi d'autres substances vasoactives (bradykinine, prostaglandines, histamine). L'utilisation d'agents anorexigènes qui perturbent le fonctionnement du système sérotoninergique comme la fenfluramine (ou la dexfenfluramine) est associée à l'apparition de lésions valvulaires cardiaques semblables à celles observées dans les tumeurs carcinoïdes. Le rôle de ces molécules dans le contexte de l'hypertension artérielle pulmonaire sera évoqué plus loin (4.2 Hypothèse sérotoninergique dans l'HTAP).

2.1.3.3. Rôle cardiovasculaire

La 5-HT est connue depuis longtemps pour ses propriétés vasoconstrictrices au niveau vasculaire. Au niveau cardiovasculaire, les effets de la 5-HT vont être opposés selon les concentrations en présence. A faible dose, elle est vasodilatatrice (5-HTR couplé aux NO synthases). A forte dose, son action est plutôt vasoconstrictrice (Nugent *et al.*, 1996). Elle participe au maintien du tonus vasculaire au niveau de l'endothélium rénal, pulmonaire, cérébral et splanchnique, empêchant ainsi les vaisseaux de collaber.

En dehors du rôle dans le tonus vasculaire, la 5-HT agit directement ou de manière indirecte sur la fonction cardiaque. Elle intervient via le système nerveux central qui participe à la régulation des voies sympathiques ou parasympathiques et via le système sympathique au niveau du centre cardiovasculaire (nœud sinusal atrial). Au niveau périphérique, nombre de récepteurs sérotoninergiques participent à l'action cardiaque de la 5-HT qui régule la fréquence (tachycardie ou bradycardie) et la contractilité cardiaque. Elle agit également au niveau des artères coronaires pour médier vasodilatation ou vasoconstriction.

Parmi ces récepteurs, le récepteur 5-HT_{2B} est particulièrement important notamment au niveau du développement embryonnaire et de son rôle dans la contractilité cardiaque (3.4.4.1 Rôle cardiaque). Son action chronotrope positive (accélération de la fréquence cardiaque), inotrope (augmentation de la force de contraction) et lusitrope positive (amélioration de la relaxation) sur les cardiomyocytes est médié par les récepteurs 5-HT₄. L'inactivation du gène TPH1 entraîne une diminution des taux plasmatiques de 5-HT (92%). Les souris TPH1^{-/-} présentent des perturbations hémodynamiques et non structurales du cœur (Côté *et al.*, 2003). La cardiomégalie des souris s'accompagne de troubles du rythme avec diminution de la contractilité et de la fréquence cardiaque qui entraîne une insuffisance cardiaque sévère voire létale.

Au niveau pathologique, la 5-HT est impliquée par l'intermédiaire des nombreux 5-HTR

et de son transporteur, le SERT, dans l'insuffisance cardiaque, les troubles du rythme, l'hypertension artérielle pulmonaire, les valvulopathies cardiaques mais aussi dans les pathologies vasculaires comme la migraine ou la maladie de Raynaud (pour revue voir Kaumann *et al.*, 2006).

2.1.3.4. Rôle dans le métabolisme osseux

Le rôle de la 5-HT dans l'ostéoformation ou l'ostéodestruction est relativement récent. Il s'appuie sur quelques études expérimentales et observations cliniques notamment comme les effets secondaires osseux des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (SSRI) utilisés dans le traitement de la dépression. En effet, la dépression sévère est associée à une perte de la masse osseuse avec un risque accru de fractures. Des études ont rapporté une augmentation de la perte osseuse, une diminution de la formation osseuse et un risque accru de fracture pour des patients traités par de la fluoxétine (pour revue, Tsapakis *et al.*, 2011). Ces résultats doivent être interprétés avec précaution dans la mesure où le mécanisme d'action de ces molécules sur les tissus squelettiques n'est pas connu. Une des hypothèses évoquée est l'action du métabolite de la fluoxétine (norfluoxétine) qui est un agoniste du récepteur 5-HT_{2B} (Sanchez *et al.*, 1999), un des récepteurs participant au rôle osseux de la 5-HT (3.4.5 Rôle au niveau osseux). Des études publiées chez l'animal ont montré la présence du SERT et de récepteurs sérotoninergiques (5-HTR) dans des lignées de cellules osseuses et dans des cultures primaires d'ostéoblastes sans que leur fonctionnalités soit encore bien comprises (pour revue voir Bliziotis, 2010, Warden *et al.*, 2010). Les différents modèles d'ostéoblastes ont permis de montrer que le récepteur 5-HT_{2B} est un des seuls à augmenter durant la différenciation ostéoblastique (Collet *et al.*, 2008)

Yadav et coll. ont publié une étude intéressante sur la place de la 5-HT périphérique dans le métabolisme osseux (Yadav *et al.*, 2008). Cette étude dont les résultats ont été remis en cause, voulait apporter chez la souris la preuve génétique que Lrp5 augmente indirectement la formation osseuse en inhibant la synthèse de 5-HT au niveau de la cellule entérochromaffine. Le modèle actuellement admis postule donc que la voie canonique de signalisation de Wnt – famille de protéines qui participent à de nombreuses fonctions embryologiques et homéostatiques chez l'adulte - via Lrp5 (ou Lrp6), contrôle directement la formation et/ou la fonction des ostéoblastes. Dans l'hypothèse de Yadav *et al.* (2008), l'inhibition de la formation osseuse par la 5-HT a lieu exclusivement via le 5-HT_{1B}R. Des questions analytiques se posent quant aux méthodes

de dosages utilisés pour mesurer la 5-HT et la fraction réellement mesurée. Il est question dans l'article de fractions tantôt plasmatique, tantôt sanguine, tantôt sérique. Le rôle du récepteur 5-HT_{1B} devant aussi être clarifiée dans la mesure ou il n'a jusqu'à présent jamais été retrouvé (ni en ARN ni en protéine) au niveau ostéoblastique.

Cui et coll. viennent d' invalider l'hypothèse de régulation de la masse osseuse par la 5-HT périphérique via Lrp5. Ils montrent en effet, l'absence de modification des taux de 5-HT sanguins et tissulaires et l'absence de modification de la masse osseuse par des invalidations conditionnelles du gène *LRP5* (Cui *et al.*, 2011). Ils confirment ces résultats sur la masse osseuse par l'invalidation génétique du gène *TPH1* et l'inhibition pharmacologique de l'enzyme. La question reste posée quant au rôle du transporteur de la 5-HT. L'ARN_m de la *TPH1* et du *SERT* ont été détectés dans les ostéoblastes (Bliziotis *et al.*, 2006) et les ostéoclastes. Le *SERT* est fonctionnel dans les ostéoblastes et son implication dans le métabolisme osseux a été confirmée *in vivo*. En effet, la souris invalidée pour le gène *SERT* présente une réduction de la formation osseuse sans augmentation de la résorption, ce qui se traduit par une masse osseuse réduite, une architecture altérée et des propriétés mécaniques amoindries (Warden *et al.*, 2005). Le phénotype de ces souris a été confirmé pharmacologiquement en traitant des souris sauvages par de fortes doses de fluoxétine. Ces résultats doivent être interprétés en tenant compte de la capacité de fixation de la fluoxétine et de ses métabolites (norfluoxétine en particulier) aux récepteurs 5-HT₂ (surtout 5-HT_{2B}) (Sanchez *et al.*, 1999), ainsi que du contrôle du récepteur 5-HT_{2B} sur le *SERT* (Launay *et al.*, 2006). Il en résulte que la diminution de la prolifération des ostéoblastes après traitement par la fluoxétine pourrait être due à une action directe sur les récepteurs 5-HT_{2B}.

Le rôle de la 5-HT dans la physiologie osseuse, notamment par l'intermédiaire des ostéoclastes, vient d'être réévaluée très récemment ((Chabbi-Achengli *et al.*, 2012). Les auteurs montrent que les souris *TPH1*^{-/-} ont un remodelage osseux perturbé avec un déficit d'ostéodestruction qui entraîne une diminution de la masse osseuse chez les souris jeunes. Ces souris présentent une diminution de la résorption osseuse associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes. Ils suggèrent un rôle local de la 5-HT dans la différenciation et peut être aussi dans la prolifération des ostéoclastes (non mesurée). De plus, cette étude répond en partie à la question de la synthèse locale de la 5-HT : en effet, les ostéoclastes seraient capables après activation de synthétiser de la 5-HT ; la question reste néanmoins posée quant à l'importance de cette production locale. Il serait

intéressant de voir quels effets produirait l'inhibition génétique conditionnelle ou l'inhibition pharmacologique de la TPH1 au niveau des différentes lignées d'ostéoclastes et d'ostéoblastes. Il reste également à déterminer quelles conséquences aura cette découverte sur le rôle de la 5-HT dans les pathologies osseuses.

2.1.3.5. Rôle embryologique

Des découvertes récentes viennent étayer le rôle embryologique déjà connu de la 5-HT (pour revue voir Gaspar *et al.*, 2003). Il semble que le rôle sur le développement du fœtus soit essentiellement joué par la 5-HT maternelle (Côté *et al.*, 2007) ou bien par action au niveau placentaire (Bonnin *et al.*, 2011). Les embryons de mère TPH1^{-/-} présentent des défauts morphologiques (surtout au niveau de l'encéphale) identiques quelque soit leur génotype (TPH1^{-/-}, TPH1^{+/-}). Ceci suggère que les malformations ne dépendent pas du génotype de l'embryon et sont dépendantes du taux de sérotonine maternelle reçu pendant le développement embryonnaire. Le taux de sérotonine maternelle des souris Tph1^{-/-} (3-15% du WT) n'est pas suffisant pour le développement embryonnaire normal, puisque 80 à 90% des embryons nés de mères TPH1^{-/-} sont petits et/ou présentent des malformations. La 5-HT maternelle est nécessaire au bon développement cardiaque chez le fœtus (Côté *et al.*, 2007). Il reste à savoir comment la 5-HT passe la barrière placentaire. Chez la souris, il a été montré que le placenta est capable de synthétiser transitoirement de la 5-HT *in utero* au cours du développement fœtal (Bonnin *et al.*, 2011). Les auteurs ont étudié chez la souris le rôle de cette production de 5-HT dans le développement neuronal de l'embryon. Il reste à donc à confirmer le rôle probable de la 5-HT (maternelle et placentaire) dans le développement du cerveau.

2.1.3.6. Autres rôles de la 5-HT

D'autres rôles moins connus ont été décrits pour la 5-HT. Elle est impliquée dans la régénération hépatique, le rôle des plaquettes y serait primordial via la libération de facteurs de croissance et de 5-HT (Lesurtel *et al.*, 2006). Elle interviendrait aussi dans diverses pathologies hépatiques (hépatite stéatosique non alcoolique, cirrhose, etc...).

La 5-HT a également d'autres fonctions embryologiques et métaboliques. Elle participe chez la souris en gestation à la prolifération des cellules β des îlots de Langeras du pancréas par l'intermédiaire du 5-HT_{2B}R (Kim *et al.*, 2010). D'autant qu'il est connu

depuis de nombreuses années que la 5-HT est stockée avec l'insuline dans ces cellules. L'injection à forte dose de 5-HT chez le chien provoque une sécrétion d'insuline (Lechin *et al.*, 1975) mais il a fallu attendre l'année 2009 pour confirmer le rôle de la 5-HT dans la régulation de la glycémie (Paulmann *et al.*, 2009). En effet, elle régule chez la souris la sécrétion d'insuline. Le mécanisme d'action passe par la sérotonylation qui permet notamment à la sérotonine d'activer de petites GTPases qui vont conduire à la sécrétion d'insuline. Ce processus, qui passe par la liaison de la 5-HT sur certains résidus glutamine des protéines grâce aux transglutaminases, permet entre autres de déclencher la sécrétion plaquettaire des granules α (Walther *et al.*, 2003).

Enfin, le rôle de la 5-HT dans l'hématopoïèse vient d'être confirmé récemment. Peu d'études étaient disponibles jusqu'à présent, la plupart des études se focalisant sur le rôle plaquettaire de la 5-HT dans l'hémostase et moins sur la formation des plaquettes et les précurseurs de la lignée plaquettaire. La 5-HT augmente de façon dose-dépendante le nombre de progéniteurs mégacaryocytaires (CFU-MK), l'ajout d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₂ comme la kétansérine bloque cet effet (Yang *et al.*, 1996). L'absence de 5-HT périphérique entraîne une érythropoïèse inefficace qui aboutit à un phénotype d'anémie macrocytaire (Amireault *et al.*, 2011). En effet, les souris invalidées pour le gène *TPH1* présentent une différenciation de la lignée des globules rouges (érythrocytes) perturbée. Cette anomalie ne s'explique pas par un blocage au niveau de la différenciation mais plutôt par un défaut de prolifération. Ceci est confirmé par l'ajout de 5-HT (ou d'un agoniste 5-HT₂R) qui provoque la prolifération *in vitro* des précurseurs érythroïdes. Les souris *TPH1*^{-/-} ont un chiffre de plaquettes et de globules rouges (GR) diminués, diminution qui s'accompagne d'une diminution de la durée de vie *in vitro* des GR. Ces données préliminaires montrent que la 5-HT est capable d'augmenter la demi-vie des GR une fois prélevés et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques en transfusion.

2.2. Les récepteurs à la sérotonine

Les récepteurs à la sérotonine (5-HTR) ont pour ligand la 5-HT qui est un des plus anciens neurotransmetteurs connus dans l'évolution. Peu après l'apparition des RCPG il y a plus d'un milliard d'années, la majeure partie des 5-HTR ont divergé bien avant les récepteurs cholinergiques, adrénergiques et dopaminergiques. Ils représentent

probablement les premiers récepteurs à 7 domaines transmembranaires de la famille de la rhodopsine capables d'interagir avec une substance chimique. Leur apparition remonte à 700-800 millions d'années chez les organismes eucaryotes unicellulaires comme la paramécie. Les 5-HTR sont conservés tout au long de l'évolution (planaire, nématode *C. elegans*, drosophile, homme). La 5-HT interagit avec une très grande variété de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et de récepteurs ionotropiques (comme certains récepteurs à l'acétylcholine, au GABA et au glutamate).

La classification actuelle (Andrade *et al.*, 2011) est basée sur le récepteur humain pour s'affranchir des variations inter-espèces. Les 5-HTR sont regroupées en 7 familles incluant des critères pharmacologiques, transductionnels et structuraux. L'information structurale étant considérée comme primordiale dans la compréhension de la fonction et permet d'expliquer *in fine* la signature pharmacologique d'un récepteur.

Ces récepteurs sont associés à une myriade de protéines (Maurice *et al.*, 2011), d'enzymes et de transporteurs, organisé au sein d'un vaste ensemble, le signalosome sérotoninergique.

Les informations qui seront détaillées pour chaque sous classe de 5-HTR ont été rassemblées dans un tableau (Annexe 1) (pour une description plus détaillée, voir Hannon *et al.*, 2008)

3. Le récepteur 5-HT_{2B}

3.1. Découverte

L'histoire de la découverte du récepteur 5-HT_{2B} est assez originale et remonte à l'un des premiers dosages de 5-HT réalisé sur le fundus de rat dans la fin des années 50 (Vane, 1957). La capacité de contraction du fundus de rat par la 5-HT n'était pas due au 5-HT_{2A}R dans la mesure où aucune trace d'ARN_m codant ce récepteur n'a pu y être retrouvé. Pourtant, le récepteur en question avait une pharmacologie assez voisine. Le récepteur ne fut mis en évidence qu'en 1992 par clonage moléculaire chez le rat (Foguet *et al.*, 1992) et chez la souris (Loric *et al.*, 1992) et en 1994 chez l'homme (Choi *et al.*, 1994). D'abord nommé Serotonin Like Receptor (SLR) (Foguet *et al.*, 1992), 5-HT₂ like (Loric *et al.*, 1992), et 5-HT_{2F} (Wainscott *et al.*, 1993), il devient 5-HT_{2B} grâce à la classification réalisée par Daniel Hoyer en 1994. Le gène est situé sur le chromosome 2 (2q36.3-2q37.1) (Le Coniat *et al.*, 1996) et code pour une protéine de 481 acides aminés

qui possède 2 exons et 3 introns. De nombreuses études pharmacologiques réalisées par la suite sur d'autres espèces confirmèrent la « parenté » pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} avec le 5-HT_{2C}.

3.2. Pharmacologie

Le récepteur 5-HT_{2B} possède une affinité élevée pour son ligand endogène, la 5-HT ($K_d \sim 10$ nM). De plus, le récepteur est la cible de nombreux dérivés non spécifiques du sous-type 5-HT₂, dérivés métaboliques et substances psychoactives ou illicites. Les agonistes sont nombreux : nordexfenfluramine (métabolite de la dexfenfluramine), méthylergonovine (métabolite du méthysergide), MDA (métabolite du MDMA ou ecstasy), tryptamine et LSD (acide lysergique diéthylamide). En ce qui concerne les antagonistes : clozapine, lisuride, mésulergine et métergoline. L'étude pharmacologique du récepteur a vraiment progressé depuis la mise au point de dérivés sélectifs (voir Annexe 1). L'agoniste partiel BW723C86 est connu pour avoir une sélectivité 10 fois plus importante pour le 5-HT_{2B} que pour le 5-HT_{2C} et 100 fois plus importante que pour le 5-HT_{2A} (Baxter, 1996). De nombreux antagonistes existent dont le RS-127445 qui est le composé le plus sélectif actuellement disponible avec une affinité subnanomolaire pour le récepteur 5-HT_{2B} ($pK_B = 9,5$) et un facteur de sélectivité de 1000 par rapport aux autres récepteurs et canaux ioniques de la même famille (Bonhaus *et al.*, 1999).

Il faut noter que la pharmacologie et les niveaux d'expression du récepteur varient d'une espèce à l'autre. Par exemple, le récepteur de souris présente une affinité 100 fois plus faible pour la sérotonine que celle étudiée chez le rat ou chez l'homme (Manivet *et al.*, 2002). Cet élément est important pour comprendre le rôle et les implications du récepteur en physiopathologie humaine lors des extrapolations faites à partir des modèles animaux

3.3. Voies de couplage

Le récepteur 5-HT_{2B} appartient à la famille des RCPG. Il partage une organisation structurale ainsi que des voies de couplages communes. Le récepteur possède 5 voies de couplage (Figure 20) : la voie G_q, la voie mitogène, le couplage aux NO synthases, la voie de la phospholipase A2 (PLA2) et le couplage aux métalloprotéases (MMP) via la NADPH oxydase.

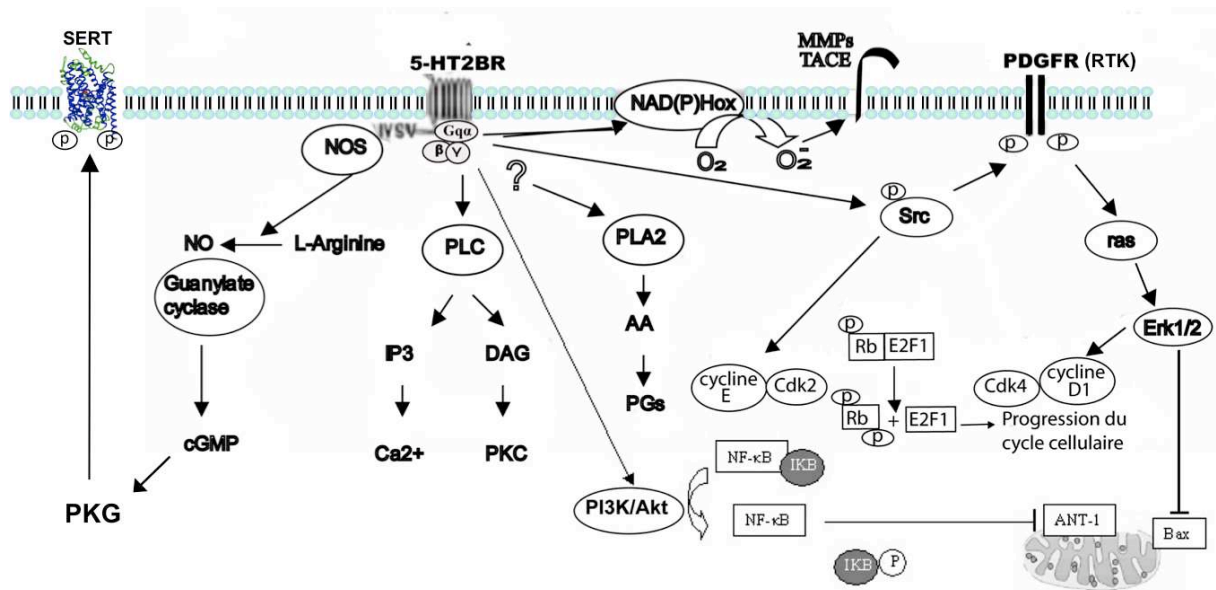


Figure 20 Différentes voies de couplages du récepteur 5-HT_{2B}

3.3.1. Voie de signalisation classique : G_q/G₁₁

Comme les deux autres récepteurs du sous-type 5-HT₂, la stimulation du récepteur 5-HT_{2B} entraîne l'activation d'une GTPase et la production d'IP₃ sur des lignées de fibroblastes de souris transfectées déficientes en thymidine kinase (LMTK⁻). Cette activité GTPasique n'est pas inhibée par les toxines pertussique et cholérique ni par des anticorps anti protéine G_s ou G_i. L'inhibition de cette activité par l'utilisation d'anticorps anti protéine G_{q/11} confirme le rôle de la protéine G_{q/11} dans l'activation du récepteur. L'activation de G_{q/11} entraîne la dissociation en deux sous unités : G_{qα} lié au GTP et un dimère β-γ. Il s'ensuit l'activation de la phospholipase C_β (PLC_β) qui va conduire à l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et 1,2-diacylglycérol (DAG). Ce dernier active les protéines kinase C (PKC). L'IP₃ permet la libération de calcium depuis le réticulum vers le cytoplasme. D'après les données obtenues sur différents modèles expérimentaux (muscle lisse, estomac de rat, tumeur carcinoïdes), l'activation de cette voie n'existe pas *in vivo* pour le récepteur 5-HT_{2B}.

3.3.2. Voie mitogénique et transactivation

L'activation du récepteur transfecté dans des fibroblastes des souris LMTK⁻ conduit à une augmentation d'activité mitogénique se traduisant par l'activation rapide du proto-oncogène p21ras sous forme GTP-ras (Launay *et al.*, 1996). L'activité GTPasique qui augmente après ajout de 5-HT passe par la voie classique (G_q) et dans un second temps par Ras. Elle va aboutir au recrutement de la voie des MAPKs via p42mapk/p44mapk

(ERK2/ERK1). Cette activation est corrélée à l'augmentation de la division cellulaire 5-HT dépendante. Cette voie est importante car elle contribue chez les mammifères après activation suite à différents stimuli (facteurs de croissance, hormones ou neurotransmetteurs) à phosphoryler des facteurs de transcriptions essentiels à la division cellulaire. Dans le cas du récepteur 5-HT_{2B}, le pouvoir mitogénique s'accompagne d'un pouvoir de transformation oncogénique par le biais de la 5-HT qui permet la formation de foci et la transformation de foci en tumeur chez des souris *nude* exprimant le récepteur. Ce pouvoir de transformation régresse par l'utilisation d'antagoniste du récepteur. La présence du récepteur a également été mise en évidence dans des coupes de tissus issus de tumeurs carcinoïdes humaines.

Le mécanisme permettant d'expliquer le rôle du récepteur dans la progression du cycle cellulaire a été démontrée dans des cellules transfectées par l'hyper phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) et l'activation des cycline kinases cdk4/D1 et cdk2/E. L'induction de l'expression de la cycline D1, mais non de la cycline E, est sous le contrôle de la voie des MAPK, indiquant une régulation indépendante de ces deux cyclines.

L'activation du récepteur 5-HT_{2B} augmente aussi l'activité de la kinase c-Src, membre de la famille des Src qui sont des intermédiaires majeurs entre le récepteur 5-HT_{2B} couplé à G_q et les régulateurs du cycle cellulaire. L'inhibition de c-Src abolit la réponse induite par la 5-HT : (i) la phosphorylation du domaine tyrosine kinase du récepteur au PDGF (PDGFR) et l'activation des MAPKs; (ii) l'expression de la cycline D1 et la cycline E ; (iii) l'incorporation de [³H]-thymidine. Le 5-HT_{2B} contrôle via c-Src l'induction de la cycline E et la synthèse de la cycline D1 par transactivation du PDGFR et le recrutement de la voie ERK/MAPK (Nebigil *et al.*, 2000).

3.3.3. Voie d'activation des NO synthases

Il a été montré sur les cellules sérotoninergiques 1C11* que le récepteur 5-HT_{2B} peut, après stimulation, déclencher la production intracellulaire de GMP_c par activation des cNOS (NOS constitutives) et de iNOS (NOS inducible), enzymes responsables de la production du monoxyde d'azote (NO) (Manivet *et al.*, 2000). L'activation de la voie des cNOS est dépendante des protéines PDZ, protéines adaptatrices contenant des domaines PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1) capables d'interagir au niveau du motif carboxy-terminal (E-X-V/I-S-X-V) du récepteur 5-HT_{2B}. La fixation est nécessaire au recrutement

de la voie de transduction de cNOS, alors que le recrutement de iNOS est sous le contrôle de la protéine $G_{\alpha 13}$. Le motif E-X-V/I-S-X-V C-terminal est similaire pour les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Le rôle de ce motif dans le couplage du récepteur est important dans la mesure où la perte du motif entraîne une perte de couplage avec les NOS et une augmentation de la prolifération cellulaire (Deraet *et al.*, 2005). La production de GMP_c par les guanylates cyclases à partir du NO permet au récepteur 5-HT_{2B} de contrôler l'activité du SERT via la protéine kinase G (Launay *et al.*, 2006). Au niveau des artères cérébrales et de la veine jugulaire, l'activation du récepteur 5-HT entraîne la relaxation des vaisseaux via le monoxyde d'azote (Schmuck *et al.*, 1996).

3.3.4. Voie de signalisation anti-apoptotique

Le rôle du 5-HT_{2BR} dans la signalisation anti-apoptotique a été démontré sur des cardiomyocytes de souris en culture. L'induction de l'apoptose par privation de sérum est inhibée par la 5-HT sur des cardiomyocytes sauvages alors que les cardiomyocytes de souris pour lesquelles le gène du récepteur 5-HT_{2B} a été invalidé ne sont pas protégés. Le mécanisme de protection passe par l'activation de deux voies de signalisation distinctes : ERK et Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt entraîne la translocation du facteur de transcription NF- κ B qui participe à la régulation de l'expression de la protéine mitochondriale translocatrice ANT-1, composant essentiel de la perméabilité membranaire des mitochondries. L'hypothèse de la participation du récepteur dans l'apoptose a pu être déduit des interactions iNOS /NF- κ B (Zingarelli *et al.*, 2002).

L'activation d'ERK1/2 induite par la 5-HT permet le maintien d'une expression à bas bruit de la protéine pro-apoptotique Bax et empêche l'activation de la mort cellulaire par inhibition de la libération du cytochrome c et par inhibition des caspases 9 et 3 (Nebigil *et al.*, 2003).

3.3.5. Voie d'activation de la phospholipase A2

La lignée cellulaire 1C11 dérivant de cellules d'un carcinome embryonnaires de souris ont la faculté de se différencier soit en précurseurs noradrénergiques soit en précurseurs sérotoninergiques (1C11^{*/5-HT}). La lignée 1C11* a la faculté d'exprimer, de lier, de stocker et de métaboliser la 5-HT après une différenciation induite par un dérivé de l'AMP_c (Buc-Caron *et al.*, 1990). Ce modèle permet d'étudier les interactions des différents récepteurs dans le programme de différenciation sérotoninergique. Les

récepteurs 5-HT_{1B/1D} et le 5-HT_{2B}R apparaissent à J+2 puis le récepteur 5-HT_{2A}R à J+4 (Kellermann *et al.*, 1996). En plus de montrer ces cellules 1C11* ont permis de montrer qu' à J+2, la stimulation du 5-HT_{2B}R entraîne l'activation de la PLA2 et la libération d'acide arachidonique. Tournois et coll. démontrent que l'activation de la voie PLA2 permet au 5-HT_{2B}R d'inhiber l'activation du récepteur 5-HT_{1B/1D} par un mécanisme dépendant de la cyclo-oxygénase (COX) (Tournois *et al.*, 1998). Ce mécanisme d'inhibition est aboli par l'activation du 5-HT_{2A} exprimé à partir de J+4. Le mécanisme d'action exact n'est pas connu. Il passerait par un des produits issus de l'activation de la COX (leucotriènes, prostaglandines).

3.3.6. Voie de couplage aux métalloprotéases (MMP)

La lignée cellulaire 1C11* a également permis de montrer un couplage du récepteur 5-HT_{2B} à la protéine TACE (ADAM 17 ou enzyme de conversion du TNF- α) qui appartient à la famille des ADAM qui sont des métalloprotéases membranaires (Pietri *et al.*, 2005). Ce couplage fait intervenir la NADPH oxydase et permet au récepteur de contrôler la production d'espèces réactives dérivés de l'oxygène (ROS).

C'est un des mécanismes qui montrent comment le 5-HT_{2B} contrôle au niveau neuronal le métabolisme de la 5-HT via l'activation du TNF- α après clivage par la protéine TACE (Schneider *et al.*, 2006).

3.4. Fonctions physiopathologiques

3.4.1. Sites d'expression chez l'adulte

Le récepteur 5-HT_{2B} a été découvert dans le fundus gastrique du rat adulte (Foguet *et al.*, 1992), puis dans le cœur, l'intestin et plus faiblement dans le cerveau et le rein de souris. Par la suite, il a été détecté dans certaines zones du cerveau de rat : cervelet, cortex, hippocampe, amygdale (Duxon *et al.*, 1997). Des localisations similaires ont été observées dans le cerveau de souris (Choi *et al.*, 1996). Chez le rat et la souris, la présence de ce récepteur dans le cerveau apparaît quantitativement limitée. La répartition périphérique du récepteur 5-HT_{2B} se trouve au niveau des systèmes cardio-vasculaire et gastro-intestinal, des tissus lymphoïdes, des poumons et du cœur.

Des études moléculaires réalisées chez différentes espèces de mammifères ont permis d'identifier le récepteur 5-HT_{2B} au niveau des vaisseaux sanguins, y compris au niveau

des tissus méningés, incluant les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses (Bonhaus *et al.*, 1995, Ullmer *et al.*, 1995). Chez l'homme, l'ARN_m du récepteur 5-HT_{2B} est exprimé en grande quantité dans le rein, le foie et à taux plus faible dans le poumon, le cerveau, le cœur, le placenta, le pancréas, la rate et la moelle épinière (Choi *et al.*, 1994). Le récepteur 5-HT_{2B} a aussi été détecté au niveau des noyaux du raphé dorsal (Bonaventure *et al.*, 2002) et dans la moelle épinière de rat, de chat, de singe et d'homme.

3.4.2. Rôle embryologique

Chez la souris, l'ARN_m du récepteur 5-HT_{2B} a été mis en évidence entre les jours 8 et 9 post coïtum (jpc), période à laquelle aucun transcrit n'a été retrouvé pour les deux autres récepteurs 5-HT₂ (Choi *et al.*, 1997). L'expression du récepteur 5-HT_{2B} a été confirmée par des études pharmacologiques (pour revue voir Lauder *et al.*, 2000). Sa présence est maximale au niveau des cellules du myocarde, des somites et de la crête neurale. L'utilisation d'un ligand sélectif des récepteurs 5-HT₂ et agoniste inverse pour le sous type 2B comme la ritansérine sur des cultures d'embryons provoquent l'apparition de défauts morphologiques dans la région céphalique, le cœur et le tube neural. Le traitement par cet agoniste inverse perturbe la migration des cellules de la crête neurale, induit leur apoptose et entraîne une différenciation anormale du myocarde ventriculaire. Ces données indiquent le rôle prépondérant du récepteur 5-HT_{2B} dans la régulation des cellules de la crête neurale et la différenciation myocardique à un stade précoce de l'embryogenèse de la souris (Choi *et al.*, 1997).

3.4.3. Rôle au niveau du tractus gastro-intestinal

Au niveau gastro-intestinal, le récepteur 5-HT_{2B} est connu depuis longtemps pour sa capacité à provoquer la contraction du fundus de rat (Vane, 1957). Chez l'homme, il a été mis en évidence dans les couches musculaires lisses et dans le plexus nerveux myentérique du colon où il participe à la contraction intestinale (Borman *et al.*, 2002). Expérimentalement, la stimulation du récepteur par la 5-HT ou d'autres agonistes 5-HT₂ induit la différenciation des neurones entériques de rat. La différenciation est bloquée par l'utilisation d'antagonistes comme le méthysergide ou le SB206553. L'ARN_m des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} a été mis en évidence dans le TGI fœtal de rat (estomac, intestin). Ceci est confirmé par la forte immunoréactivité du récepteur 5-HT_{2B} à 15 jpc

bien qu'elle soit absente dans les ganglions myentériques matures (Fiorica-Howells *et al.*, 2000). La participation du 5-HT_{2B}R dans la physiologie de la motilité colonique a également été évoquée (Bassil *et al.*, 2009). Le récepteur participerait à cette contraction en faisant proliférer les cellules interstitielles de Cajal responsables de la contraction de la musculature gastro-intestinale (Tharayil *et al.*, 2010).

3.4.4. Rôle vasculaire

3.4.4.1. Rôle cardiaque

Chez la souris, le 5-HT_{2B}R est un des acteurs majeurs du développement cardiaque comme le montre les résultats obtenus lors de l'utilisation d'antagonistes (Choi *et al.*, 1997). Ce rôle fondamental dans le développement cardiaque précoce a été confirmé définitivement par l'inactivation génétique du récepteur (Nebigil *et al.*, 2000). La délétion du récepteur provoque la mort *in utero* par malformations cardiaques chez 25 à 30 % des embryons. Les embryons 5-HT_{2B}^{-/-} décédés sont caractérisés par l'absence de trabécule septo-marginale, ce qui témoigne d'un défaut de prolifération et de migration des cellules trabéculaires affectant ainsi l'organisation des sarcomères. Il s'ensuit une deuxième phase de létalité pendant la première semaine de vie conduisant à la mort de 30 % des souriceaux nouveaux-nés. Ils présentent une dilatation cardiaque causée par des défauts de contractilité et des malformations structurales au niveau des jonctions entre cardiomyocytes. Ceci aboutit à l'hypoplasie des ventricules dont les parois sont très amincies (Nebigil *et al.*, 2000). Les souris adultes invalidées présentent une dilatation ventriculaire et une diminution de la fonction systolique sans modification de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle ni d'anomalie du développement valvulaire. Ceci laisse à penser que le récepteur ne contribue pas physiologiquement au développement de ces paramètres à l'état basal. En outre, la surexpression du récepteur 5-HT_{2B} chez la souris au niveau des cardiomyocytes conduit à une cardiomyopathie hypertrophique compensée, associée à une prolifération des mitochondries (Nebigil, 2003), ce qui est compatible avec le couplage au NO qui contrôle le nombre de mitochondries (Nisoli *et al.*, 2003).

Des données récentes permettent d'impliquer le récepteur 5-HT_{2B} dans l'étiopathogénie de certaines pathologies cardiaques comme les cardiomyopathies et notamment dans l'hypertrophie cardiaque. L'invalidation génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} permet de prévenir la survenue d'une hypertrophie induite par la perfusion

d'isoprénaline mimant *in vivo* une stimulation adrénergique (Jaffré *et al.*, 2004). Le récepteur est également capable de réguler la production de cytokines hypertrophiques (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) produites par les fibroblastes cardiaques.

Cette absence d'hypertrophie chez les souris invalidées serait due en réalité non pas à l'absence du récepteur sur les cardiomyocytes mais à son absence sur des cellules non cardiomyocytaires (ex : fibroblastes cardiaques). En effet, l'invalidation génétique sélective du récepteur sur la population de cardiomyocytes ne conduit pas à l'apparition d'une hypertrophie induite par l'isoprénaline (Jaffré *et al.*, 2009). Cette étude a également mis en évidence une surexpression du récepteur sur des biopsies ventriculaires de patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique, surexpression corrélée avec les taux plasmatique de cytokines (IL-6, TGF- β) et de noradrénaline. L'inhibition de la production de ces cytokines hypertrophique est bloquée par le 5-HT_{2B}R *in vitro* et *in vivo* mais ce couplage permet *in vitro* de prévenir la libération de ces cytokines par les fibroblastes même en absence de 5-HT, suggérant un rôle entre ce récepteur et les récepteurs AT₁-R et β_2 -AR. De plus, la libération des cytokines hypertrophiques induite par la 5-HT est inhibée par l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur AT-1. Ceci passe par un mécanisme de transinhibition entre les récepteurs 5-HT_{2B}R et l'AT₁-R.

Alors que dans les cardiomyopathies dilatées humaines, le rôle du récepteur 5-HT_{2B} émerge progressivement, son rôle dans l'hyperplasie valvulaire avec fibrose et/ou régurgitation est plus qu'établi. Les lésions histologiques de l'atteinte valvulaire qui ont été observées chez certains patients atteints de tumeurs carcinoïdes (Robiolio *et al.*, 1995) sont identiques à celles des patients ayant reçu des dérivés de l'ergot de seigle ou amphétaminiques (ex dérivés anorexigène type fenfluramine) dont leurs catabolites ont pu être identifiés comme des agonistes du récepteur 5-HT_{2B} (Fitzgerald *et al.*, 2000). La sélectivité de ces dérivés comme la norfenfluramine ($K_i \approx 30$ nM) pour le récepteur explique la fibroplasie observée chez l'homme. Il s'avère que le récepteur est très exprimé au niveau des valves cardiaques. La pathologie valvulaire 5-HT_{2B} induite se traduit par une prolifération de myofibroblastes (Figure 21).

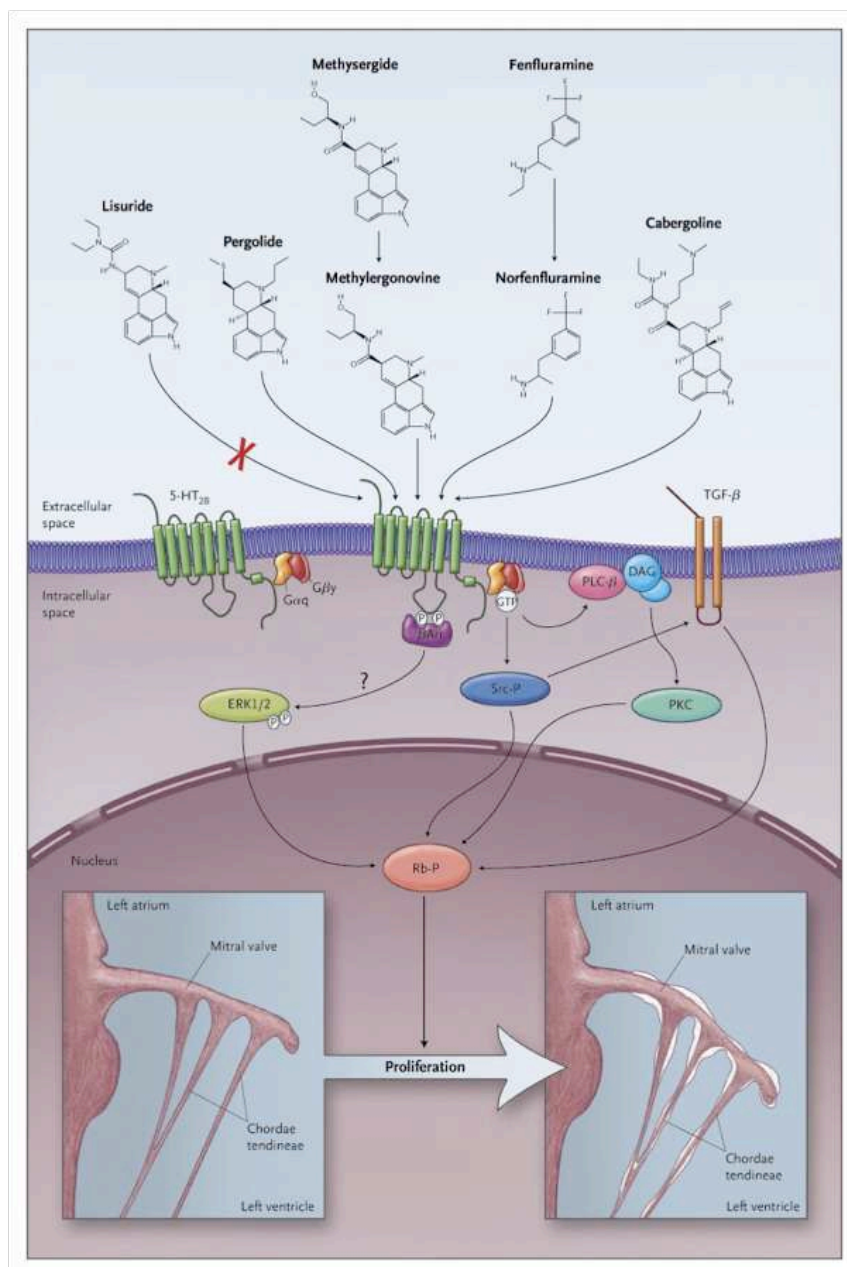


Figure 21. Mécanisme moléculaire proposé dans l'apparition de valvulopathies induites par le récepteur 5-HT_{2B} (d'après Roth, 2007). A la suite de l'activation du récepteur par des dérivés de l'ergot de seigle (pergolide, methysergide, cabergoline) ou des dérivés de la fenfluramine, différents effecteurs cellulaires vont être mobilisés pour aboutir *in fine* à la prolifération cellulaire des cellules valvulaires à l'origine de l'apparition de la maladie.

3.4.4.2. Rôle neurovasculaire : migraine

Des modifications des taux circulants de sérotonine et de ses métabolites ont été observé au cours des crises de migraine. Les traitements de fond ont longtemps utilisés des molécules à fort tropisme sérotoninergique comme la dihydroergotamine. Leur action repose sur l'antagonisme des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} (Schaerlinger *et al.*, 2003). La corrélation entre l'affinité de ces molécules et leur potentiel thérapeutique

plaide en faveur d'un rôle important du récepteur 5-HT_{2B} dans la migraine. La douleur associée aux crises de migraine est causée par l'excitation d'une des branches du nerf trijumeau au niveau des vaisseaux méningés. Il a été retrouvé de l'ARN_m du récepteur 5-HT_{2B} à ce niveau et le récepteur induit la relaxation des vaisseaux cérébraux par la libération de monoxyde d'azote (NO), responsable de la dilatation des vaisseaux cérébraux avec activation concomitante des fibres trigéminovasculaires (Schmuck *et al.*, 1996). Le blocage du récepteur inhibe l'extravasation plasmatique induite par le m-CPP chez le cochon d'Inde (Johnson *et al.*, 2003). De plus, le gène *HTR2B* a été proposé comme facteur de susceptibilité à la migraine (Corominas *et al.*, 2010).

3.4.4.3. Hypertension artérielle systémique

Alors que la contraction de l'aorte après traitement par la 5-HT est médiée par le 5-HT_{2A}R chez le rat normotensif, elle passe sous le contrôle du 5-HT_{2A} et du 5-HT_{2B} chez le rat hypertensif (Watts *et al.*, 1996). L'étude *in vivo* dans le modèle *DOCA-salt* de rats hypertendus (diète salée associée à une perfusion continue de désoxycortisone) a confirmé le rôle du récepteur 5-HT_{2B}. L'utilisation d'antagoniste (LY-272015) a permis de réduire la pression artérielle des animaux les plus hypertendus. En fait, la diminution n'est visible qu'à partir de la 3^{ème} semaine d'induction de l'hypertension, l'antagoniste étant sans effet dans la phase précoce de l'hypertension et provoquant à l'opposé chez les rats normotensifs une augmentation légère mais significative de la pression artérielle (Watts *et al.*, 1999). Un rôle différent du récepteur 5-HT_{2B} est donc à envisager selon sa localisation vasculaire (artères de moyens ou grands calibres). L'augmentation de l'expression du récepteur 5-HT_{2B} durant le développement de l'hypertension induite par la desoxycorticostérone pourrait expliquer l'implication tardive du récepteur dans la réponse hypertensive (pour revue voir Watts *et al.*, 2011).

De plus, le modèle de rat hypertensifs traités à la N(ω)-nitro-L-arginine (inhibiteur des NO synthases) entraîne une modification de la réponse à la 5-HT semblable à celle observée dans le modèle *DOCA-salt* associé à une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT_{2B} (Russell, 2002).

3.4.4.4. Rôle dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

Le rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans l'hypertension artérielle pulmonaire sera évoqué dans le chapitre suivant (4. Le 5-HT_{2B}R dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP))

3.4.5. Rôle au niveau osseux

L'étude des récepteurs sérotoninergiques s'appuie notamment sur la lignée mésoblastique (C1) capable de récapituler *in vitro* les étapes de l'ostéogénèse, de la chondrogenèse ou de l'adipogenèse. Comme vu précédemment, la 5-HT a été évoquée comme un des acteurs de la formation osseuse. Les travaux réalisés sur cette lignée mésoblastique C1, ont permis d'analyser le profil d'expression des récepteurs sérotoninergiques. Au cours de cette différenciation, les premières expériences de fixation ont montrées que le [¹²⁵I]-DOI, agoniste sélectif mais partiel des 5-HT₂R se fixait sur les cellules C1. Détecté d'une part dans le modèle du clone C1 et d'autre part dans les cultures primaires de calvaria murines, le récepteur 5-HT_{2B} présente dans les deux cas une pharmacologie particulière. Pour les cultures primaires de calvaria de souris sauvages, la constante de dissociation (K_d) (qui reste invariante au cours de la différenciation ostéogénique) est de l'ordre de 7 nM. Cette valeur est au moins 3 fois plus faible que celle généralement décrite chez la souris (K_d = 22 nM chez la souris). Même si ces valeurs de K_d augmentent au cours du temps, elles sont toujours inférieures à celles décrites dans la littérature : lignée neuronale murine 1C11* : K_d = 21 nM (Kellermann *et al.*, 1996) et LMTK transfectées avec 5-HT_{2BR} : K_d = 14 nM (Loric *et al.*, 1995).

Le récepteur 5-HT_{2B} participe de manière autocrine et paracrine à la différenciation ostéogénique. Il permet d'obtenir la différenciation en ostéocyte par activation de la voie des NO synthases et celle de la PLA2. La production du NO et de l'acide arachidonique sont nécessaires à une minéralisation optimale (Locker *et al.*, 2006). L'étude *ex vivo* des récepteurs sérotoninergiques à partir de cultures primaires d'ostéoblastes de souris a mis en évidence la présence de récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. Cependant, seule l'expression protéique du récepteur 5-HT_{2B} augmente au cours de la différenciation ostéoblastique. De plus, l'étude du phénotype osseux de souris 5-HT_{2BR}^{-/-} a permis de confirmer et de préciser l'activité de ce récepteur dans le métabolisme osseux. Seules les femelles âgées présentent une ostéogénie par diminution de l'ostéoformation. Cette diminution de la masse osseuse s'explique par un défaut de recrutement des ostéoprogéniteurs et par une diminution de la prolifération des ostéoblastes. De plus, l'inhibition (pharmacologique ou génétique) du récepteur 5-HT_{2B} dans les ostéoblastes diminue l'incorporation de calcium dans la matrice extracellulaire (Collet *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT_{2B}, est un médiateur physiologique de la formation osseuse. Le récepteur est également capable de réguler de façon post-

traductionnelle l'activité de la protéine TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase), qui est un acteur du processus de minéralisation (Baudry *et al.*, 2010).

3.4.6. Rôle au niveau du SNC

L'activité du récepteur 5-HT_{2B} au niveau du SNC n'est pas clairement définie. Il s'avère que l'expression protéique du récepteur 5-HT_{2B} a été démontrée dans des cultures primaires d'astrocytes de rats sans qu' aucune fonction ne soit alors associée à cette expression (Sandén *et al.*, 2000). Une étude a montré que le BW723C86, agoniste partiel du récepteur 5-HT_{2B}, présentait des propriétés anxiolytiques chez le rat (Kennett *et al.*, 1998) mais ce résultat n'a jamais été confirmé avec un agoniste total sur d'autres modèles expérimentaux d'anxiété. En outre, il a été montré que le récepteur 5-HT_{2B} jouait un rôle régulateur au niveau du centre de contrôle respiratoire (tronc cérébral) de la souris et du rat (Günther *et al.*, 2006).

A ceci vient s'ajouter le rôle du récepteur dans les phénomènes d'addiction aux substances psychoactives. L'équipe de L. Maroteaux a montré que le récepteur 5-HT_{2B} contrôle chez la souris la réponse locomotrice au MDMA (ou ecstasy), puissant psychotrope, qui provoque la libération de sérotonine en agissant notamment sur le SERT, ceci après la découverte du couplage 5-HT_{2B}R/SERT (Launay *et al.*, 2006). L'ablation génétique ou l'inhibition pharmacologique du 5-HT_{2B}R abolit la réponse induite par le MDMA ainsi que la libération de 5-HT dans les noyaux accumbens et dans l'aire tegmentale ventrale (Doly *et al.*, 2008). Concernant la dexfenfluramine, le récepteur contrôle la réponse hypophagique de cet anorexigène maintenant retiré du marché comme le montre la réduction du pic hypothalamique de 5-HT et les modifications comportementales observées chez les souris 5-HT_{2B}R^{-/-} ou les souris traité avec l'antagoniste sélectif RS127445 (Banas *et al.*, 2011). Le rôle du récepteur a également été évoqué dans l'impulsivité à la suite de la découverte d'un codon stop (Q20*) au niveau du gène *HTR2B*. La présence de cette mutation est associée à une augmentation des pathologies psychiatriques et à un comportement impulsif chez les patients condamnés ou avec des antécédents d'agressions physiques violentes (Bevilacqua *et al.*, 2010).

3.4.7. Génétique

La première mise en évidence d'un éventuel rôle du gène 5-HT_{2B} humain (*HTR2B* MIM 601122) concerne les troubles obsessionnels compulsifs. Un SNP a été décrit dans l'exon 1 du récepteur sans pour autant avoir été confirmé au niveau fonctionnel (Kim *et al.*, 2000).

Une mutation hétérozygote R393X a été détectée dans le gène *HTR2B* chez une femme atteinte d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) qui 5 ans plus tôt avait reçu un traitement anorexigène (fenfluramine) pendant 9 mois. La mutation aboutit à une modification de couplage du récepteur (Blanpain *et al.*, 2003, Deraet *et al.*, 2005).

Plus récemment, un double polymorphisme situé dans la partie N-terminale du récepteur (R6G/E42G) a été associé à l'abus de substances stupéfiantes (Lin *et al.*, 2004). Ce polymorphisme est important dans le cadre de ce travail de thèse, qui a étudié rôle dans la physiopathologie de l'HTAP induite par la prise de dérivés de la fenfluramine (voir 4.4 Etude du polymorphisme N-terminal R6G/E42G (article 2)).

Enfin, la seule mutation faux sens (codon stop) qui a été décrite concerne une cohorte clinique finlandaise. La présence de la mutation Q20* est associée à une augmentation des pathologies psychiatriques et à un comportement impulsif chez des patients condamnés ou connus pour avoir commis des agressions physiques (Bevilacqua *et al.*, 2010).

3.4.8. Autres rôles

Comme évoqué précédemment, la 5-HT peut se comporter comme un puissant agent mitogène. Au niveau hépatique, elle participe à la prolifération et à la régénération du foie par le biais des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. Une surexpression de ces récepteurs a été mise en évidence chez la souris après hépatectomie partielle. L'utilisation d'antagonistes mixtes (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}) inhibent la régénération hépatique (Lesurtel *et al.*, 2006). Le récepteur 5-HT_{2B} est un marqueur spécifique de fibrose hépatique chez le rat. Absent dans le foie sain, il apparaît après traitement par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) au niveau des cellules stellaires hépatiques (CSH), cellules impliquées dans le développement de la fibrose (Ruddell *et al.*, 2006). Le rôle du 5-HT_{2B}R dans le foie semble complexe, l'effet de la 5-HT via les récepteurs 5-HT_{2B} dépendant de l'état « clinique » de l'organe. En effet, des résultats très récents démontrent le rôle du

récepteur dans la prolifération des CSH. La stimulation du récepteur 5-HT_{2B} ferait intervenir entre autres le TGF- β , suppresseur connu de la prolifération hépatique. En cas de maladie hépatique chronique, les perspectives thérapeutiques s'orienteraient plus vers un antagonisme du récepteur. *In vitro*, l'antagonisme du récepteur ou l'invalidation du gène diminuent la fibrose chez la souris et favorisent la régénération hépatique (Ebrahimkhani *et al.*, 2011).

Le rôle du récepteur dans la régulation de la glycémie a également été mis en évidence. Chez la souris, l'expression du récepteur augmente pendant la grossesse pour se normaliser en fin de gestation (Kim *et al.*, 2010). L'utilisation d'un antagoniste sélectif du 5-HT_{2B}R provoque une intolérance au glucose seulement chez les souris gestantes par inhibition de la prolifération des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.

3.5. Données de modélisation moléculaire

Comme pour nombre de GPCR, l'absence de structure 3D disponible pour les récepteurs 5-HT et plus particulièrement pour le récepteur 5-HT_{2B} a conduit notre équipe à réaliser une modélisation du récepteur par homologie. Compte tenu de l'absence d'informations structurales, nous nous sommes focalisés prioritairement sur l'étude du site de liaison du ligand naturel. Ceci a permis l'élaboration d'un premier modèle 3D du récepteur composé de 7 hélices ou domaines transmembranaires (DTM). Une grande variabilité de séquences existent chez les RCPG concernant la longueur et l'orientation des hélices transmembranaires comme sur les parties intra et extracellulaires, ce qui rend la modélisation par homologie beaucoup plus complexe (pour revue voir Worth *et al.*, 2009). Dans le cas du modèle 3D du 5-HT_{2B}R, deux patrons moléculaires ont été utilisés : la bactériorhodopsine (BR) et la rhodopsine bovine (RH). L'originalité de ce modèle est d'avoir choisi comme patron moléculaire la structure 3D de la bactériorhodopsine et non celle de la rhodopsine (Manivet *et al.*, 2002). En effet, depuis la publication de la structure 3D de la RH en 2000 (Palczewski *et al.*, 2000), la grande majorité des modèles de RCPG de classe A (Figure 22) ont été réalisés par homologie à partir de cette structure .

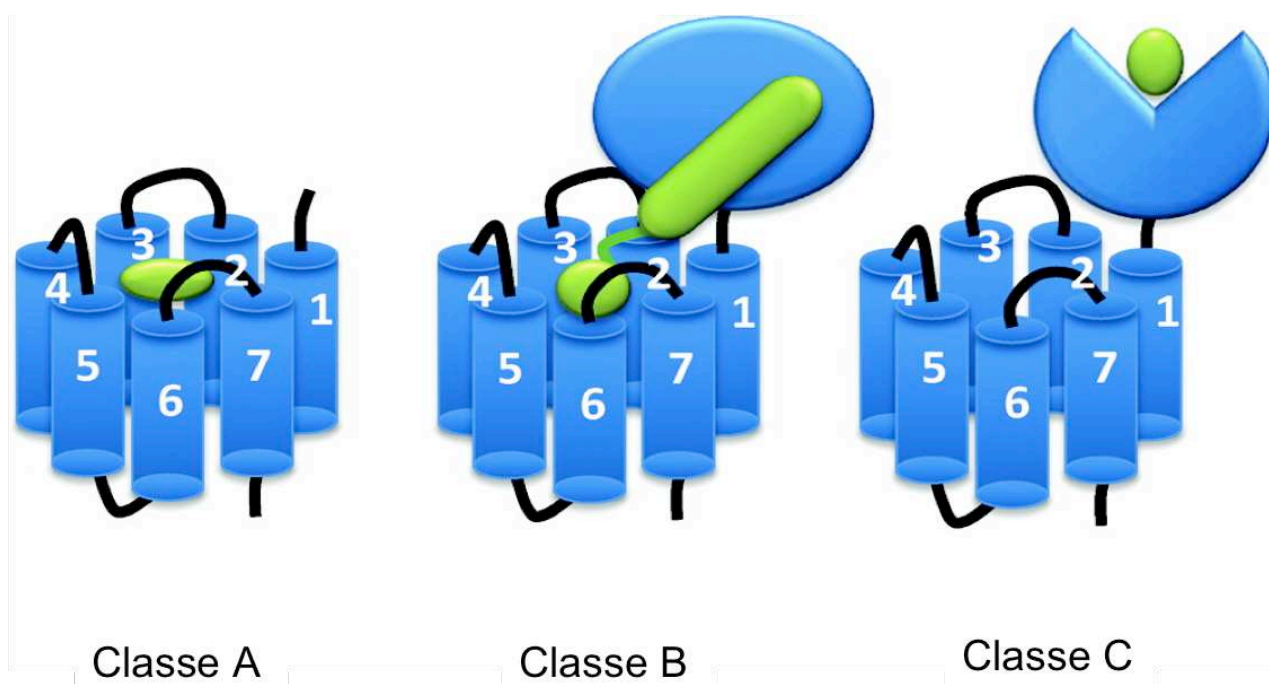


Figure 22. Organisation structurales des différentes classes de RCPG (d'après Congreve *et al.*, 2011). Le ligand naturel est coloré en vert, l'extrémité N-terminale est représentée de manière courte pour la classe A étant donné la longueur dans les 2 autres familles. Pour les RCPG de classe A, le site actif est situé au sein des 7 DTM. Dans le cas de la classe B, le ligand se lie à la fois au niveau N-terminal et aux DTM. L'activation des récepteurs de classe C est plus complexe, le ligand provoque le changement de conformation de la partie N-terminale qui provoque dans un second temps l'activation du récepteur.

La validation expérimentale réalisée par mutagenèse dirigée donne plus de robustesse au modèle 3D du 5-HT_{2B}R. Elle intervient après la génération des nombreux modèles qui passe par l'alignement des séquences et l'ajustement des modèles par dynamique moléculaire. Le choix du modèle a été fait en comparant notamment les différentes interactions entre le ligand et les modèles BR et RH réalisés pour les récepteurs humains et murins. Le site de liaison de la 5-HT a ainsi pu être mis en évidence (Figure 23). La fixation de la 5-HT dans le récepteur fait intervenir des interactions électrostatiques, hydrogènes et hydrophobes. La différence entre les modèles RH et BR portent sur la nature et le nombre d'interactions et donc sur la force d'interaction entre les résidus du récepteur et la 5-HT.

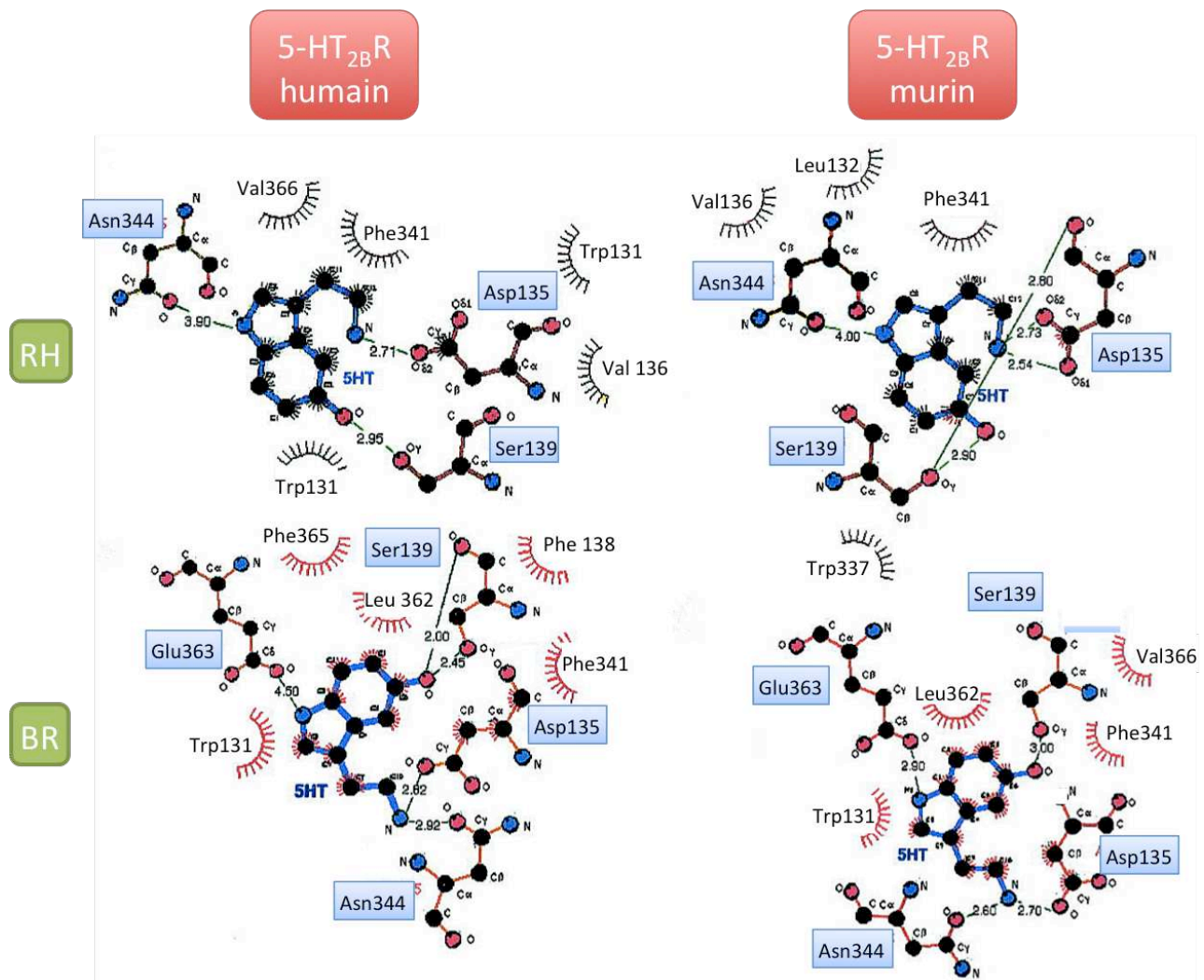


Figure 23. Site de liaison du récepteur 5-HT_{2B} proposé par modélisation moléculaire (d'après Manivet *et al.*, 2002). Les sites d'interaction de la 5-HT sont présentés pour le récepteur humain et murin pour les modèles 3D réalisés à partir de la rhodopsine (RH) et de la bactériorhodopsine (BR). Pour le récepteur murin, la numérotation des acides aminés suit la séquence humaine. Les résidus qui participent à des interactions dites polaires sont colorés en bleu, les interactions apolaires sont représentées par des résidus blancs entourés par des demi-cercles rouges.

La fonction carboxylique d'Asp135 est impliquée dans les deux modèles humains par une liaison électrostatique avec la tête cationique de la sérotonine. Dans les deux cas, la 5-HT interagit également via sa fonction hydroxyle avec Ser139. Une différence est retrouvée pour le résidu Asn344 : dans le cas du modèle BR humain, l'interaction est plus forte avec Asn344 et elle fait intervenir la tête cationique de la 5-HT ; dans le modèle RH, Asn344 n'est plus capable d'interagir via sa fonction amide avec la tête cationique de la 5-HT mais il interagit avec le groupement indole (Figure 23). Présent seulement dans le modèle BR, Glu363 renforce la liaison du neurotransmetteur en interagissant avec sa fonction indole. Sa présence dans le site de liaison s'explique par la rotation du DTM3 réalisé au cours de la construction du modèle BR en optimisant

l'interaction Asp100-Asn376, interaction fondamentale dans les GPCR et déjà décrite pour le récepteur 5-HT_{2A} (Ewing *et al.*, 2001).

A ces interactions électrostatiques viennent s'ajouter des interactions de type hydrophobe : Phe138, Phe141, Phe341, Leu362, Trp337, Phe365 formant une cage aromatique autour du ligand avec les cycles aromatiques des résidus Trp337 et Phe341 s'arrangeant de manière perpendiculaire « en forme de T » (ou *T-shaped stacking*). Ce type d'interaction aromatique est connu pour d'autres neurotransmetteurs (Hibert *et al.*, 1991).

La prédiction faite par modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de 4 résidus polaires (Asp135, Ser139, Asn344, Glu363) dans l'interaction entre le 5-HT_{2B}R humain et la 5-HT. Les résultats obtenus *in vitro* permettent de confirmer cette hypothèse par la mesure de l'affinité (K_d) et l'efficacité du récepteur (E_{max} , EC_{50}). La mesure d'IP₃ après ajout croissant de 5-HT permet de quantifier l'activation du récepteur (voie G_q) par la courbe dose-réponse avec l' E_{max} qui est l'activation maximale du récepteur et l' EC_{50} la dose à laquelle on obtient 50 % de l' E_{max} .

L'absence d'affinité pour le mutant D135A ($K_d > 10000$ nM) et d'activation du récepteur montre l'importance fondamentale de ce résidu dans la liaison à la 5-HT. Le rôle du résidu Ser139 est confirmée par la substitution d'une alanine (S139A) qui entraîne une diminution très importante de l'affinité (40 fois) sans modifier la réponse IP₃ (E_{max} , EC_{50}). Les résultats obtenus pour le mutant N344A avec une diminution d'affinité pour la 5-HT de l'ordre de 7 fois confirme le rôle de ce résidu dans la liaison à la 5-HT. Le rôle des résidus aromatiques est également validé par l'augmentation du K_d observé entre 10 et 15 fois pour les mutants W337, F341A. L'existence d'un pont salin entre Asp100 et Asn376 est démontrée par la perturbation obtenue pour les simples mutants (D100A, N376A) qui s'annule lorsqu'on inverse les deux résidus par le double mutant D100N/N376D. Cette interaction avait été mis en évidence pour le 5-HT_{2A}R (Sealfon *et al.*, 1995).

Le rôle de Glu363, résidu absent dans les autres récepteurs 5-HT₂, est confirmé par la diminution d'affinité, même si elle est moins importante (5 fois), probablement du fait de l'interaction plus faible entre la 5-HT via son noyau indole et la fonction acide carboxylique de Glu363.

Pour expliquer les différences pharmacologiques entre les récepteurs 5HT_{2B} humain et murin, plusieurs substitutions ont été réalisées en se basant sur les différences de

séquences des deux récepteurs. L'affinité 100 fois plus importante de la 5-HT (K_d humain : 12 nM, K_d souris : 1445 nM) et l'efficacité plus faible (EC_{50} humain 9nM, EC_{50} souris 676 nM) du récepteur humain par rapport au récepteur murin peut s'expliquer par une différence de flexibilité au niveau du DTM5 (Figure 24). En effet, une liaison hydrogène intrachaîne entre Thr228 et Ala231 présente chez le récepteur murin diminuerait la flexibilité du récepteur. Ceci a été confirmé par les résultats obtenus lorsque le récepteur humain porte la double mutation murine T228A/A231T.

Ce premier travail a permis la description des résidus participant à la liaison de la 5-HT et à l'activation du récepteur 5-HT_{2B}.



Figure 24. Modes d'activation des récepteurs 5-HT_{2B} humain et murin. Les deux récepteurs sont superposés : humain (rose) et murin (vert) La partie basse du DTM5 est présentée lorsque le récepteur est au repos (ER) et après son activation (EA). Les modifications de séquences du DTM5 réalisées pour le récepteur mutant humain figurent dans l'encadré blanc (d'après Manivet *et al.*, 2002).

Suite à ce travail sur le modèle 5-HT_{2B}R, deux autres récepteurs ont été modélisés à partir de la rhodopsine cette fois afin d'expliquer la différence de sélectivité du sarprogrélate entre vis à vis du 5-HT_{2A}R ($pK_i = 8,52$ nM) par rapport au 5-HT_{2B}R ($pK_i = 6,57$ nM) et du 5-HT_{2C}R ($pK_i = 7,43$ nM). Cette différence d'affinité pour le sarprogrélate s'explique au niveau moléculaire à travers des interactions complexes et nombreuses de type hydrophobe et électrostatique (Rashid *et al.*, 2003). Ainsi, le nombre d'interactions électrostatiques est plus important pour le 5-HT_{2A}R que pour les autres sous-types. L'interaction de l'acide aspartique D135 implique dans le cas du sarprogrélate une interaction de la tête cationique comme pour la 5-HT avec le 5-HT_{2B}R (Manivet *et al.*,

2002) mais aussi pour le 5-HT_{2A}R avec la fonction carboxylique de l'antagoniste. La présence d'une sérine (Ser242) chez ce dernier à la place d'une alanine pour le 5-HT_{2B}R et 5-HT_{2C}R empêche l'insertion en profondeur du sarprogrélate dans la partie hydrophobe du site actif. Un autre élément intéressant est l'absence d'interaction entre le sarprogrélate et Glu363 et Ser139 du 5-HT_{2B}R.

Une étude plus récente de modélisation a réalisé des modèles 3D des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} en incluant les parties extramembranaires, parties assez flexibles et souvent difficiles à modéliser (Kim *et al.*, 2011). Différents patrons moléculaires ont été utilisés dont celui de la rhodopsine de grenouille. De nombreux algorithmes ont été nécessaires à la construction des modèles avec une sélection basée sur des critères énergétiques avec un processus d'arrimage moléculaire pour la sélection des différents modèles réalisés en présence d'un agoniste (5-HT), d'un antagoniste et sans ligand (apo). Ces 3 modèles ont été ensuite mis en membrane avant simulation par dynamique moléculaire (DM) pour une durée de 10 ns. Un des résultats intéressants de l'étude, en plus de la description des sites actifs, est l'étude de la dynamique de ponts salins situés en fin de DTM3 et 6 : D152-R169 (1) et R153-E253 (2). D152 et R153 appartiennent au motif DRY, conservé chez de nombreux RCPG. L'évolution des distances va être différente dans les 3 modèles (apo, avec agoniste, avec antagoniste) (Figure 25). En ce qui concerne la structure en présence de l'antagoniste, on note une distance pour les ponts salins qui reste stable au cours de la simulation (1 et 2). Concernant la structure apo, seule la distance 1 reste stable, la 2 fluctuant autour de 4 Å pendant les 6 ns pour augmenter à plus de 9 Å en fin de simulation. La présence de la 5-HT semble perturber les deux ponts salins après 6 et 8 ns. La distance 2 est déstabilisée et fluctue énormément sans jamais réussir à se stabiliser pour atteindre plus de 13 Å en fin de simulation. A l'opposé, la distance 1 reste stable pendant les 8 premières ns pour terminer à plus de 9 Å. Kim et coll. montrent ainsi que l'activation (modèle agoniste) ou l'activité constitutive du récepteur (modèle apo) peuvent être étudiées à travers l'évolution dynamique des ponts salins appartenant au motif DRY. Cependant, ces résultats sont à interpréter à la lumière du rôle de ce motif dans le fonctionnement des différents RCPG de classe A. Non présent sur tous les membres de la classe A, ce motif semble impliqué dans le contrôle de l'activité intrinsèque (ou constitutive) en maintenant le récepteur à l'état inactif. Ce rôle est encore débattu. La création d'un mutant du récepteur à l'histamine (H₄) avec ce

motif ne permet pas de diminuer significativement l'activité constitutive élevée du récepteur indiquant l'implications d'autres motifs (Schneider *et al.*, 2010).

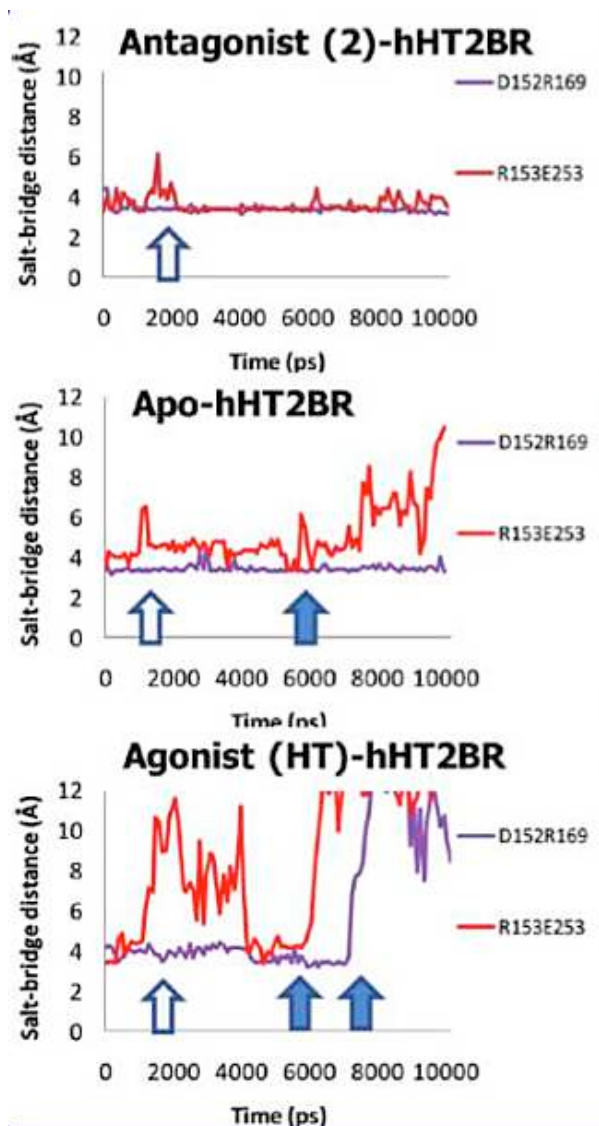


Figure 25. Evolution de la distance de deux ponts salins (D152-R169,R153-E253) pour différentes simulations du 5-HT_{2B}R (d'après Kim *et al.*, 2011). La distance figure en ordonnées (Å), le temps de simulation en abscisse (ps).

On peut déplorer l'absence de validation expérimentale des résultats obtenus en modélisation. De plus les patrons moléculaires utilisés ne sont pas les plus récents (ex : récepteur à la Dopamine D3 obtenu en présence d'un antagoniste (Chien *et al.*, 2010). De plus, les différences avec le modèle 3D du 5-HT_{2B}R issu de la bactériorhodopsine n'a pas été évoqué, aucune interaction n'ayant été retrouvé par exemple avec E363. Les résultats de modélisation que nous avons obtenu pour la partie N-terminale validés par mutagénèse vont permettre d'approfondir les mécanismes à l'origine de l'activité intrinsèque du récepteur et de préciser le rôle des résidus déjà évoqués.

4. Le 5-HT_{2B}R dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

4.1. Généralités sur l'HTAP

Le terme « hypertension pulmonaire » (HTP) décrit l'existence d'une pression accrue dans la circulation pulmonaire. Sous le terme « d'hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) sont regroupées différentes maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (ou RVP) associée à un remodelage vasculaire irréversible. L'échographie cardiaque permet le dépistage de l'HTAP, mais le diagnostic formel nécessite un cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25mmHg au repos et une pression artérielle pulmonaire supérieure à 30mm Hg à l'exercice.

Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en cinq principaux sous-groupes: les HTAP idiopathiques (HTAP_i, anciennement dénommées HTAP primitives) définies par la survenue de la maladie en l'absence de facteurs de risque connus associés, les HTAP héritables (HTAP_h, anciennement dénommées HTAP familiales), définies par plusieurs cas d'HTAP au sein d'une même famille et/ou la présence chez un patient d'une mutation d'un des gènes connus pour prédisposer au développement de l'HTAP, les HTAP associées à la consommation de toxines ou à la prise d'anorexigènes comme la fenfluramine (cf. 4.4 Etude du polymorphisme N-terminal R6G/E42G (article 2)), les HTAP associées à diverses pathologies (connectivites, infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), cardiopathies congénitales avec shunt gauche-droite, hypertension portale, schistosomiase, l'anémie hémolytique chronique) et l'HTAP persistante des nouveau-nés (Simonneau *et al.*, 2009).

L'HTAP est une maladie extrêmement rare, grave car létale avec une prédominance féminine (1,7 femmes pour 1 homme). Son incidence annuelle et sa prévalence en France sont de 2,4 cas et 15 cas par millions d'habitants respectivement (Humbert *et al.*, 2006). L'augmentation progressive de la résistance pulmonaire entraîne de nombreuses complications dont l'insuffisance cardiaque gauche ou des thrombo-embolies qui vont conduire à la mort. Malgré les nombreux traitements disponibles, le taux de mortalité

reste élevé : 15 % à 1 an, 75 % à 5 ans. Les options thérapeutiques vont de l'oxygénothérapie à la greffe pulmonaire en passant par la chimiothérapie (vasodilatateur, prostacycline, antagoniste des récepteurs de l'endothéline, inhibiteur de phosphodiesterase de type 5, etc...).

Au niveau histologique, le remodelage vasculaire conduit à l'apparition de lésions pléxiformes typiques de la maladie qui témoignent d'une prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi des artères pulmonaires (CML-AP) et des cellules endothéliales et à une migration cellulaire (macrophage, progéniteurs endothéliaux, etc...).

La dysfonction endothéliale observée au cours de l'HTAP provoque un déséquilibre à l'origine de vasoconstriction, thrombose et mitogénèse. Ce déséquilibre est à la base du rationnel de la chimiothérapie et peut être compensé par l'inhibition de l'endothéline, du tromboxane ou par l'ajout du monoxyde d'azote ou de prostacycline.

Simultanément à la dysfonction endothéliale, l'exploration des altérations vasculaires de l'HTAP a permis de confirmer les modifications fonctionnelles des CML-AP. Il s'agit d'une augmentation de la contraction et de la prolifération associée à une diminution de l'apoptose. Les modifications vasculaires observées au cours de l'HTAP expliquent pourquoi elle est considérée comme une pan-vasculopathie (Figure 26). Ceci s'accompagne d'un remodelage de la matrice extracellulaire (pour revue voir Humbert *et al.*, 2004).

L'HTAP a également une composante génétique complexe. Des mutations du gène *BMP2* ont été décrites chez 70% des patients HTAP_h et 26% des patients HTAP_i. Même si les chiffres varient d'une étude à l'autre, les mutations faux sens, non sens ou avec déplacement du cadre de lecture sur un des 2 allèles aboutissent à une perte de fonction de la protéine (pour revue voir Sztrymf *et al.*, 2007).

Le gène *BMP2* code pour une protéine réceptrice de la superfamille du TGF- β . Les récepteurs de la famille BMP sont connus depuis longtemps comme des acteurs essentiels de la régulation de la différenciation et la croissance des os et des cartilages. Plus récemment, ils ont été impliqués dans la régulation de la croissance, de la différenciation et dans l'apoptose d'autres types cellulaires comme les CML et les cellules endothéliales. La perte de fonction de *BMP2* entraîne une diminution de l'expression du récepteur *BMP2* qui augmente la prolifération et diminue l'apoptose des cellules endothéliales pulmonaires. Ce signal n'est toutefois pas suffisant comme le suggèrent de

nouvelles études. L'invalidation d'un des allèles du gène *BMPR2* chez des souris n'est pas suffisant pour provoquer l'apparition d'HTAP mesurée par la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) ou l'hypertrophie du ventricule droit. Pourtant, la réponse à la 5-HT entraîne une augmentation de la prolifération, de la contractilité vasculaire chez les souris *BMPR2*^{+/-} (Long *et al.*, 2006). Il s'agit d'une des premières démonstration de l'interaction entre les voies sérotoninergiques et la voie BMP qui permet d'accréditer la thèse sérotoninergique comme un des seconds « *hits* » nécessaire au développement de la maladie.

Bien d'autres acteurs sont impliqués dans le remodelage vasculaire présent au cours de l'HTAP comme l'inflammation mais aussi l'hypoxie. Le rôle de la moelle osseuse est évoqué depuis peu. Les cellules endothéliales des malades expriment une grande quantité d'HIF1- α qui est un des marqueurs fondamentaux de la réponse à l'hypoxie et de la chimiokine SDF1- α impliquée dans la mobilisation (ou *homing*) des cellules souches. Ils favorisent ainsi la migration cellulaire des cellules souches jusqu'aux vaisseaux pulmonaires. En effet, une prolifération clonale de précurseurs des lignées hématopoïétiques et endothéliales (hémangioblastes) a été retrouvée dans la moelle, le sang et les artères pulmonaires des malades (Farha *et al.*, 2011). Dans la moelle, on retrouve également une fibrose plus importante chez les malades sans signe évident de myéloprolifération (mutation Jak2, surexpression de STAT3 et 5). Pour autant, les malades atteints de syndromes myéloprolifératifs (myélofibrose, leucémie myéloïde chronique, etc...) sont susceptibles de développer une HTAP. Ceci permet de faire le lien entre hypoxie et maladie hématologique. La présence de cellules exprimant la protéine tyrosine kinase c-kit, marqueur commun de l'ensemble de cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques, dans les lésions pulmonaires de malades atteints d'HTAP_i renforcent cette hypothèse (Montani *et al.*, 2011).

Le rôle des miR dans l'HTAP vient d'être confirmé *in vitro* et *in vivo*. Le taux de miR-204 est corrélé à la gravité de la maladie. Sa diminution induit la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses (Couboulin *et al.*, 2011).

Le rôle de la mitochondrie dans l'hypothèse d'une modification du métabolisme au cours de l'HTAP a également été évoqué avec le passage d'un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative à celui d'un métabolisme glycolytique proche de ce qui se passe dans les cellules cancéreuses (effet Warburg) (pour revue voir Archer *et al.*, 2007).

Ces résultats doivent être interprétés avec précaution car pour le moment aucun modèle animal (souris hypoxiques, rats traités par monocrotaline) ne permet de reproduire *in vivo* toutes les caractéristiques de l'HTAP humaine (pour revue voir Stenmark *et al.*, 2009).

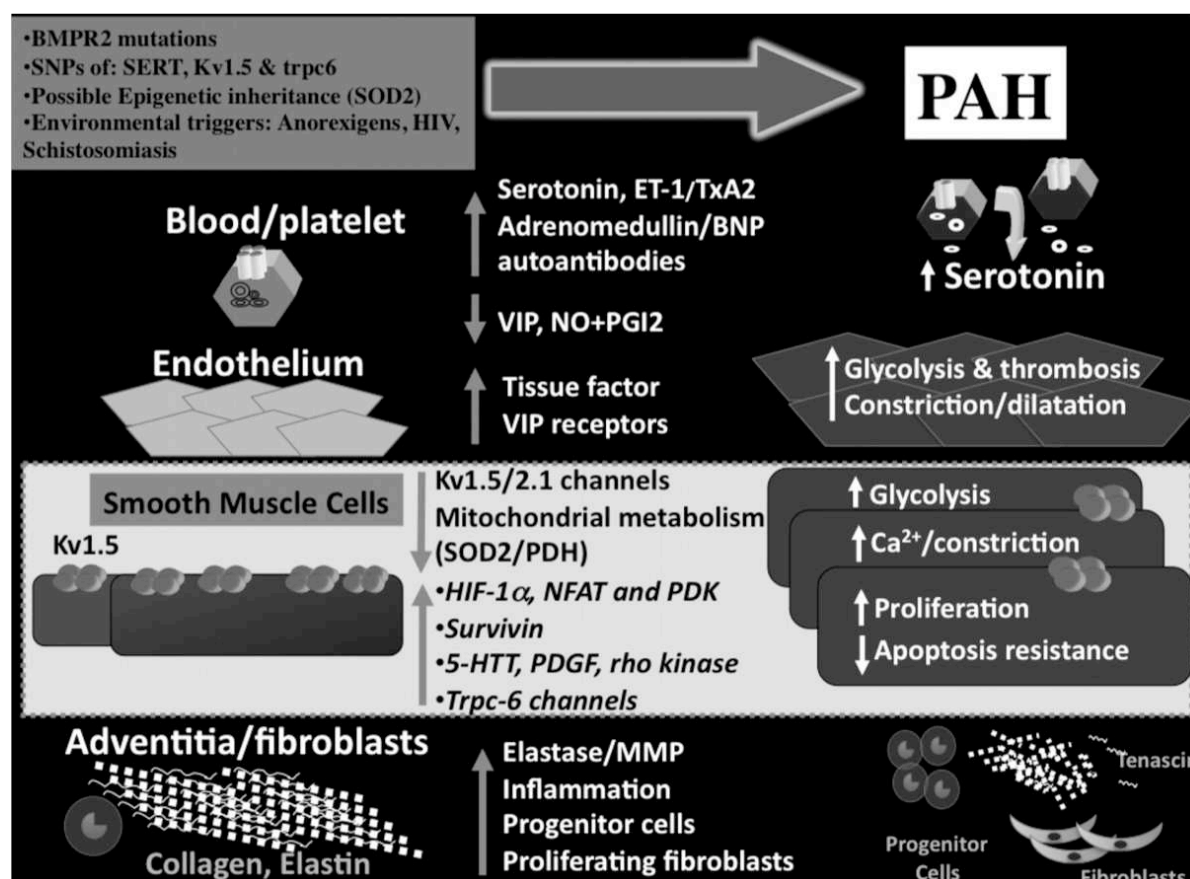


Figure 26. Modifications observées au cours de l'HTAP dans les artères pulmonaires de faible diamètre (d'après Archer *et al.*, 2010). L'HTAP implique les acteurs cellulaires de toutes les couches cellulaires: plaquettes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes. Sans être causale, les modifications observées peuvent servir de base à un développement thérapeutique. SOD2 superoxyde dismutase de type 2; ET-1, endotheline-1; TxA2, thromboxane A2; BNP, peptide natriurétique de type B; PGI2, prostacyline; 5-HTT, transporteur de la sérotonine, MMP, métalloprotéase matricielle.

4.2. Hypothèse sérotoninergique dans l'HTAP

4.2.1. Rôle de la 5-HT

Les premiers travaux que nous avons réalisés pour faire le lien entre métabolisme du système sérotoninergique et l'HTAP débutent réellement en 1995 par la découverte d'une augmentation de la concentration plasmatique de 5-HT chez 16 patients atteints d'HTAP (Hervé *et al.*, 1995) alors que la 5-HT dosée sur sang total reste normale et la

concentration de 5-HT plaquettaire est diminuée. Un trouble du stockage plaquettaire en 5-HT semble impliqué. Un autre résultat intéressant est la persistance de ces modifications chez 6 patients ayant subi une greffe cœur-poumon, laissant évoquer une origine extrapulmonaire de la maladie. Ces résultats viennent confirmer l'observation faite quelques années auparavant : un cas d'HTAP a été rapporté chez un patient atteint de la maladie congénitale du pool vide plaquettaire qui entraîne une absence de granules denses stockant la 5-HT (Hervé *et al.*, 1990). La déplétion en contenu plaquettaire s'accompagne chez ce patient d'une augmentation des taux de 5-HT plasmatique (29 nM vs 2nM pour les contrôles). De plus, la kétansérine qui est un antagoniste du 5-HT_{2A}R et des VMAT provoque chez ce patient une diminution (partielle) de la résistance pulmonaire vasculaire, ceci à cause des remodelages déjà en présence, aboutissant à une réponse contractile diminuée. Ceci a été confirmé par la présence de lésions plexiformes dans les coupes d'artères pulmonaires obtenues en post mortem. Il a été montré plus tard que l'élévation de la 5-HT n'est pas provoqué par un trouble de l'activation plaquettaire (Kéreveur *et al.*, 2000).

Ces résultats doivent être interprétés en intégrant les contraintes analytiques importantes inhérentes aux dosages de 5-HT particulièrement pour le dosage de 5-HT plasmatique (contamination plaquettaire). Les techniques mises au point et utilisées dans notre service depuis de nombreuses années font partie des techniques de référence pour le dosage de 5-HT (pour revue voir Brand *et al.*, 2011). Une des difficultés principales réside dans la contamination plaquettaire du pool plasmatique conduisant à surévaluer les taux plasmatiques. Sans cela, il n'est pas possible de comprendre pourquoi d'autres équipes ont pu trouvé un taux de 5-HT plasmatique normal chez des malades en dosant la 5-HT par une méthode ELISA (Lederer *et al.*, 2008). Nos résultats ont été confirmés par la suite par la mesure de la 5-HT plasmatique et par l'augmentation des taux urinaires de 5-HIAA qui est le métabolite principal de la 5-HT (Kéreveur *et al.*, 2000, Kirillova *et al.*, 2009). Le modèle correspondant chez le rat (*fawn hooded*) aboutit au développement d'une HTAP sévère en conditions normoxiques et hypoxiques (Sato *et al.*, 1992).

Le rôle de la 5-HT dans le développement de l'HTAP est renforcé par les résultats obtenus chez des souris TPH1^{-/-} soumises à l'hypoxie (Morecroft *et al.*, 2007). Par rapport aux souris sauvages qui développent une HTAP avec une insuffisance cardiaque et un remodelage vasculaire au niveau pulmonaire suite à l'hypoxie chronique, les souris

invalidées montrent une diminution de l'hypertrophie du ventricule droit et du remodelage vasculaire. La réponse contractile à la 5-HT n'est pas influencée par l'invalidation génique.

Plus récemment, le rapprochement entre les voies 5-HT et celle de BMP fournit un nouvel argument pour le rôle de la 5-HT. En effet, comme vu précédemment la 5-HT favorise l'apparition d'une HTAP chez des souris partiellement invalidées pour BMPR-2 en conditions hypoxiques (Long *et al.*, 2006). Une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi des artères pulmonaires (CML-AP) des souris BMPR2^{+/-} est mise en évidence par une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée en réponse à la 5-HT. La réponse proliférative fait intervenir ERK1/2, un des acteurs classique de la réponse proliférative à la 5-HT. L'ajout d'un inhibiteur de la NADPH oxydase qui régule la production d'anions superoxydes inhibe cette réponse. Or, l'activation de la NADPH oxydase fait partie des voies de couplage du 5-HT_{2B}R (Pietri *et al.*, 2005). Le rôle du récepteur 5-HT_{2B}R est rarement évoqué. Les auteurs montrent que la réponse proliférative est inhibée par la kétansérine qui n'est pas un simple antagoniste du 5-HT_{2A}R mais aussi des VMAT. Le mécanisme moléculaire d'interaction entre la 5-HT et BMPR-2 fait donc intervenir les récepteurs 5-HT₂. La voie inhibitrice des Smad (Smad-1 et Smad-5) maintient un phénotype antiprolifératif pour les CML-AP. L'inhibition des Smad 1/5/8 par la 5-HT explique ainsi l'effet hyperprolifératif induit par l'administration de 5-HT (Liu *et al.*, 2009).

4.2.2. Rôle du SERT

L'HTAP s'accompagne d'une augmentation du taux de 5-HT plasmatique. L'étude de l'hypothèse sérotoninergique est donc passé par l'étude du rôle du SERT dans la maladie. En effet, la démonstration de son rôle dans la physiopathologie de la maladie est attestée par de nombreuses études sans que son rôle chez l'homme soit totalement clarifié (Eddahibi *et al.*, 2000, MacLean *et al.*, 2004, Morecroft *et al.*, 2005).

L'invalidation génétique du transporteur atténue les signes d'HTAP chez l'animal en conditions hypoxiques (Eddahibi *et al.*, 2000). La diminution (significative) de la RVP est de 16% à 2 semaines (S2) et de 20 % à 5 semaines (S5) d'hypoxie. L'hypertrophie du ventricule droit est moins importante chez les souris SERT^{-/-} que chez les souris sauvages : -19 % à S2 et - 26 % à S5.

De manière surprenante, les épisodes d'hypoxie aiguë (courte) augmentent la RVP de souris invalidées génétiquement pour le transporteur. L'invalidation génétique du SERT influence également le remodelage vasculaire en diminuant la musculation des artères pulmonaires consécutive à l'hypoxie. Pour aller plus loin, la surexpression du SERT a été évaluée ainsi que le rôle de l'un des polymorphismes déjà décrit. La présence d'une insertion (allèle L, long) ou d'une délétion (allèle S) dans le promoteur du gène va influencer le niveau d'expression du transporteur.

Selon les types cellulaires, l'allèle aboutit à un niveau d'expression pour l'ARN_m du SERT entre 2 et 3 fois supérieure à celui de l'allèle S (Lesch *et al.*, 1996). Les taux d'expression relatifs varient d'une étude à l'autre et d'un phénotype à l'autre (L/L, L/S, S/S). Cet élément doit être gardé à l'esprit quand on interprète les études d'associations génétiques concernant le SERT.

Ces travaux se basent sur le constat que le SERT serait surexprimé dans les lésions pulmonaires et dans les vaisseaux pulmonaires des patients atteints d'HTAP. Les résultats sur des cultures de CML-AP obtenues à partir d'un échantillon restreint de malades (8) montrent une augmentation de l'expression du SERT associée à une augmentation de la prolifération (incorporation de [³H]-thymidine) réversible après inhibition du transporteur (Eddahibi *et al.*, 2001). Ils montrent à partir du même échantillon de patients, des différences fonctionnelles (recapture de la 5-HT et incorporation de humidifié) entre les différents phénotypes de SERT.

Les auteurs rapportent des différences de génotype concernant le SERT entre malades (84) et patients (89). Par contre, il ne retrouve pas de différence entre les 20 patients ayant pris des anorexigènes (facteur de risque d'HTAP) et les 69 autres malades. Ils vont ensuite conclure un peu rapidement à une corrélation phénotypique (7 malades et 18 témoins) entre taux de recapture de la 5-HT, prolifération de CML-AP et génotype du SERT. Or les échantillons ne sont pas homogènes entre les trois expériences.

Dans le modèle de souris hypoxiques, la surexpression du transporteur entraîne l'apparition d'une HTAP avec augmentation des RVP et hypertrophie ventriculaire droite associée à un remodelage vasculaire intense (MacLean *et al.*, 2004). Paradoxalement, l'hypoxie entraîne une diminution de l'expression du SERT comme le montre l'immunomarquage des cellules pulmonaires et les études de liaison chez les souris sauvages et les souris surexprimant le SERT.

Quel intérêt peut avoir la surexpression du SERT alors qu'il est sous exprimé dans différents modèles d'animaux hypoxiques. Sans avoir d'explications claires à ce sujet à part invoquer des différences entre les modèles animaux, on peut douter du rôle prépondérant du SERT. L'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (SSRI) comme la fluoxétine chez la souris permet d'inhiber le développement d'une HTAP induite par l'hypoxie (Marcos *et al.*, 2003). Sans avoir de données sur des échantillons de malades, il est difficile de conclure.

Les études génétiques réalisées par la suite sur des cohortes humaines plus importantes n'ont pas retrouvé d'association entre polyphorphismes du SERT et HTAP (Baloira *et al.*, 2011, Machado *et al.*, 2006).

Les résultats d'une étude récente montre que le traitement ne permet pas d'obtenir d'amélioration clinique pour les patients HTAP traités par un inhibiteur sélectif de la recapture de la 5-HT (SSRI) comme la fluoxétine par rapport aux témoins (Dhalla *et al.*, 2012). De la même façon, l'utilisation de SSRI en fin de grossesse aboutit à une augmentation des cas d'hypertension artérielle chez le nouveau né (Chambers *et al.*, 2006). D'après les données disponibles à ce jour le choix du SERT comme cible thérapeutique ne semble pas être pertinent dans le traitement de l'HTAP.

La question de l'HTAP induite par les anorexigènes dans lequel le SERT est impliqué sera traitée dans la prochaine section.

4.2.3. Rôle des récepteurs sérotoninergiques

Le récepteur 5-HT_{2A} a été longtemps connu comme un des médiateurs de la contraction artérielle pulmonaire chez l'homme. En réalité, le rôle des récepteurs sérotoninergiques dans la contraction des artères pulmonaires dépend du calibre des artères et de l'espèce étudiée. Dans les grosses artères pulmonaires humaines, les récepteurs 5-HT₁ médient la contraction induite par la 5-HT. Chez le rat, la réponse contractile à la 5-HT dans la circulation pulmonaire est médiée par le récepteur 5-HT_{2A} en conditions normoxiques. Cependant, chez le rat qui développe une HTAP induite par l'hypoxie, la réponse à la 5-HT est augmentée et médiée par le récepteur 5-HT_{1B} (pour revue voir MacLean *et al.*, 2000). Ces résultats sont confirmés par l'augmentation de la quantité ARN_m du récepteur 5-HT_{1B} retrouvée au niveau des vaisseaux pulmonaires. Le récepteur 5-HT_{1B} est impliqué dans le développement de l'HTAP induite par l'hypoxie comme le montre

les résultats des études menées avec un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1B/1D} et/ou avec des souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur 5-HT_{1B} (5-HT_{1B}^{-/-}) (Keegan *et al.*, 2001). Après exposition à une hypoxie chronique, ces souris ne développent pas d'hypertrophie du ventricule droit, à la différence des souris sauvages. De la même manière, le remodelage vasculaire et l'augmentation de la réponse à la stimulation par la 5-HT sont diminués chez les souris 5-HT_{1B}^{-/-} par rapport aux souris sauvages. De plus, l'augmentation du récepteur a été montrée sur un modèle d'HTAP expérimental de porc (Rondelet *et al.*, 2003) et sur des échantillons humains (augmentation moins importante que celle du 5-HT_{2BR}) (Launay *et al.*, 2002).

Le récepteur 5-HT_{2A} contrôle la contraction des vaisseaux dans de nombreux territoires vasculaires. Au niveau des vaisseaux pulmonaires, il coexiste avec le récepteur 5-HT_{1B} et serait responsable de la contraction à des doses de 5-HT supérieures aux doses physiologiques (Morecroft *et al.*, 1999). L'utilisation d'un antagoniste non sélectif comme le sarprogrélate empêche le développement de l'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat (Hironaka *et al.*, 2003, Morecroft *et al.*, 2005) et inhibe la réponse contractile pulmonaire à la 5-HT chez des rats hypoxiques (Morecroft *et al.*, 2005). Pourtant, la kétansérine (antagoniste du 5-HT_{2AR}) n'a jamais donné de bons résultats dans le traitement de l'HTAP (Hervé *et al.*, 1990). En plus de son effet antagoniste sérotoninergique, cette molécule possède une activité bloquante non sélective sur le VMAT et adrénergique qui provoque des hypotensions systémiques importantes.

De nombreuses questions restent posées sur les modifications observées entre l'HTAP et d'autres formes plus bénignes (réversible) comme l'hypertension artérielle induite par l'altitude (hypoxie). La progression de la maladie s'accompagne d'une prolifération clonale de cellules endothéliales, de la migration de cellule souches et l'activation de métalloprotéase qui entraîne un remodelage de la matrice extracellulaire. Le rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans l'HTAP répond en partie à ces observations.

4.3. Rôle du 5-HT_{2BR} dans l'HTAP

Le rôle du 5-HT_{2BR} a été clairement démontré en 2002 par notre laboratoire en utilisant deux approches distinctes. L'invalidation génétique du récepteur (souris 5-HT_{2B}^{-/-}) comme l'inhibition pharmacologique par l'antagoniste sélectif RS127-44 abolissent

totalement l'apparition d'une HTAP chez les souris en conditions hypoxiques en diminuant la RVP, le remodelage vasculaire pulmonaire et la prolifération cellulaire. Ceci s'accompagne de l'inhibition de l'activité élastase et de la diminution des taux de TGF- β (Launay *et al.*, 2002). Les effets observés sont amplifiés par la dexfenfluramine (et son métabolite la nordexfenfluramine). De plus, l'HTAP est associée à une augmentation de l'expression du 5-HT_{2B}R au niveau des artères pulmonaires de la souris et de l'homme. En conséquence, l'activation du 5-HT_{2B}R semble être l'étape limitant du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Cette conclusion permet de mettre en perspective les résultats obtenus par l'invalidation du SERT ou celle du récepteur 5-HT_{1B} chez des souris hypoxiques. En effet, le développement de l'HTAP est dans ces deux cas freiné sans pour autant être aboli. Afin de bien interpréter les données obtenues concernant le SERT, il est utile de rappeler que l'activité du SERT est contrôlé par le récepteur 5-HT_{2B} (Launay *et al.*, 2006) et que le principal métabolite de la fluoxétine (norfluoxétine) est un agoniste du récepteur 5-HT_{2B} (Sanchez *et al.*, 1999). Ceci rend plus complexe l'étude du rôle joué par le transporteur. De plus, il a été montré que le taux plasmatique de 5-HT est sous la dépendance du récepteur 5-HT_{2B}, permettant d'exclure une altération des voies métaboliques de la 5-HT comme cause de l'augmentation de 5-HT plasmatique observée dans l'HTAP (Callebert *et al.*, 2006). La stimulation du récepteur produit un pic de 5-HT en conditions hypoxiques qui est aboli par l'utilisation d'antagoniste du récepteur ou chez les souris 5-HT_{2B}^{-/-}. Cette libération de 5-HT contrôlée par le 5-HT_{2B}R au niveau pulmonaire est SERT dépendante. L'utilisation d'autres antagonistes (C-122, terguride et PRX-08066) sur le modèle d'HTAP induite chez le rat par injection de monocrotaline confirme les résultats précédents : diminution de la RVP, épaississement et occlusion des artères pulmonaires sans altérations de la fonction cardiaque (Dumitrascu *et al.*, 2011, Porvasnik *et al.*, 2010, Zopf *et al.*, 2011). Concernant les cas d'HTAP et le rôle des anorexigènes, une patiente dont le récepteur 5-HT_{2B} était tronqué en C-term (R393X) a développé une hypertension artérielle pulmonaire à la suite d'un traitement à base d'anorexigène (fenfluramine) reçu 5 ans plus tôt. La mutation aboutit à une modification de couplage du récepteur entraînant une augmentation de la prolifération (Blanpain *et al.*, 2003, Deraet *et al.*, 2005).

Il s'avère que la dexfenfluramine entraîne la libération de 5-HT en faisant intervenir le SERT contrôlé par le récepteur 5-HT_{2B}. Son métabolite (la nordexfenfluramine) est un

agoniste puissant du récepteur 5-HT_{2B}, ce qui expliquerait pourquoi la prise de cette molécule serait à l'origine de la maladie (cf. 4.5.2 Le 5-HT_{2B}R dans l'hypothèse sérotoninergique de l'HTAP médicamenteuse). D'autres hypothèses ont été évoquées comme la capacité de la dexfenfluramine à avoir un effet mitogène propre, hypothèses qui ne seront pas développées ici.

Un résultat majeur qui permet de confirmer l'implication du 5-HT_{2B}R vient d'être publié par Launay et coll. Il permet de faire le lien entre la composante hématologique de l'HTAP et le système sérotoninergique. Ces résultats viennent confirmer l'implication récente du 5-HT_{2B}R dans l'hématopoïèse (Amireault *et al.*, 2011). A partir des résultats publiés précédemment sur le rôle du récepteur dans l'HTAP (Launay *et al.*, 2002) et la présence de cellules souches c-kit⁺ impliquées dans le remodelage vasculaire observé dans l'HTAP (Montani *et al.*, 2011), Launay et coll. ont étudié le rôle du récepteur exprimé dans la moelle osseuse dans la physiopathologie de l'HTAP. Ils démontrent le rôle joué par le récepteur 5-HT_{2B} dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, endothéliaux et musculaires dans l'apparition de la maladie (Launay *et al.*, 2012).

Pour bien comprendre le fil de la réflexion qui a sous tendu le travail mené par Launay et coll. jusqu'à cet article de 2012, il faut se rappeler les résultats obtenus dans l'étude de 1995. Même si les paramètres hémodynamiques et de remodelage vasculaires se sont normalisés après la greffe cœur-poumon, l'augmentation de la 5-HT a persisté comme si la maladie n'était en réalité pas guérie (Hervé *et al.*, 1995).

Des expériences d'allogreffe ont été réalisées chez des souris WT (5-HT_{2B}R^{+/+}) ou KO (5-HT_{2B}R^{-/-}) mises sous aplasie et greffées ensuite par des cellules provenant de moelle osseuse WT ou KO. Les souris sont soumises dans un second temps à un protocole d'hypoxie. Les résultats obtenus sont patents. Les souris qui ont une moelle osseuse WT deviennent sensibles à l'hypoxie et développent une HTAP. De façon inverse, les souris WT greffées par une moelle KO sont résistantes à l'HTAP induite par l'hypoxie. Des résultats similaires sont obtenus pour les souris dont le gène *5-HT2B* est invalidé de manière sélective dans la moelle osseuse. Les niveaux d'expression du 5-HT_{2B}R au niveau pulmonaire sont corrélés à la nature de la moelle des souris (KO ou WT). Les résultats obtenus ne dépendent pas du modèle expérimental choisi car ils sont reproduits dans le modèle d'HTAP induit par la monocrotaline. On peut donc envisager à la suite de ces résultats le rôle prépondérant du récepteur dans l'HTAP et l'origine

(médullaire) des cellules proliférantes présentes au niveau pulmonaire qui expriment le 5-HT_{2B}R. Les cellules exprimant le récepteur sont en fait des précurseurs hématopoïétiques c-kit⁺ retrouvés d'abord au niveau de la moelle qui migrent ensuite au niveau de la maculature pulmonaire. Cette hypothèse est renforcée par la co-localisation partielle entre le 5-HT_{2B}R et c-kit au niveau de la couche de cellules musculaires lisses (intima) des petites artères pulmonaires. Ces données inédites démontrent l'origine médullaire et donc extrapulmonaire des cellules impliquées dans l'hyperplasie de l'intima. D'autres résultats obtenus dans cette étude montrent le rôle du récepteur dans la différenciation des précurseurs des différentes lignées (endothéliales, musculaires). De plus, le 5-HT_{2B}R interagit aussi dans ce contexte avec le PDGF-R qui est un récepteur à tyrosine kinase (RTK) comme le montre la diminution d'expression du récepteur sérotoninergique provoqué par un inhibiteur de RTK (STI571). Ces résultats ouvrent la voie à des travaux futurs sur la relation entre altération de l'hématopoïèse, prolifération anormale de cellules musculaires lisses et migration pulmonaire des cellules souches. Le développement d'une HTAP consécutive à une greffe de moelle osseuse dans le traitement des leucémies (Isu-wan *et al.*, 2006) et dans les syndromes myeloprolifératifs chroniques (Adir *et al.*, 2010) plaide en ce sens.

4.4. Etude du polymorphisme N-terminal R6G/E42G (article 2)

Article 2 :

Gain of function 5-HT_{2B} receptor polymorphisms associated with pulmonary arterial hypertension induced by fenfluramine derivatives

Arnauld Belmer*, Claude Hercend*, Stéphane Doly, Barbara Girerd, David Montani, Vincent Setola, Katia Boutourlinsky, Jean-Marie Launay, Marc Humbert, Luc Maroteaux, Philippe Manivet

* Co-auteurs ayant participé de manière égale aux travaux.

En cours de soumission à Circulation

Abstract

Millions of patients worldwide have been exposed to new drugs for the treatment of obesity, Parkinson's disease, or migraine. However, important safety signals

emphasized that chronic exposure to numerous drugs (methysergide, benfluorex, dexfenfluramine, fenfluramine, ecstasy, pergolide ...) or their metabolites (methylergonovine, norfenfluramine, MDA) can induce valvular heart disease and/or pulmonary arterial hypertension (PAH). The mechanism responsible has been identified as the result of an “off-target” effect via activation of 5-HT_{2B} receptor leading to inappropriate cell proliferation of cardiac valves or pulmonary arteries. Since an extreme minority of patients exposed to these compounds develops these severe cardiopulmonary side effects, the need of other predisposing factors, such as genetic susceptibility, has to be postulated, with these agents acting adversely only in those predisposed subjects.

As a model system, we investigated putative *HTR_{2B}* gene variants in 91 patients with PAH induced by fenfluramine derivatives. This study identified functional polymorphisms in the N-terminus of the 5-HT_{2B} receptor that increase coupling efficiency of a wide range of agonists and segregate with patients developing PAH.

This study underpins the importance of investigating the genetic targets of identified off-target's marketed drug and in particular, the potential devastating stimulation of these *HTR_{2B}* risk alleles by drugs with potent 5-HT_{2B} receptor agonist properties.

INTRODUCTION

Over the past five decades, several new drugs for the treatment of obesity, Parkinson's disease, and migraine have been introduced into clinical use. Several years later, physicians identified patients that had developed cardio-pulmonary diseases after drug exposure. The common theme in the development of these diseases is the interference with serotonin metabolism and receptor activation. At present, it is impossible to differentiate between those patients who will be affected and those who will not and the timeframe in which significant drug-induced disease will develop is also unclear. Investigation of individual susceptibility needs to establish which factors identify patients who are at risk of developing drug-induced disease, and needs to establish the possible role of genetic polymorphisms. Therapy might then be tailored according to an individual's risk.

Reports of pulmonary arterial hypertension (PAH) and valvulopathy led to the withdrawal of fenfluramine derivatives (anorexigens) and pergolide (antiparkinson drug) from the market in 1997 and 2007, respectively. Pharmacologically, fenfluramine derivatives (fenfluramine, dexfenfluramine, benfluorex and their active metabolite norfenfluramine), dopamine agonists (pergolide and cabergoline), amphetamines (MDMA and its metabolite MDA), and ergot alkaloids (ergotamine, dihydroergotamine, and methysergide and its active metabolite methylergonovine) are all potent 5-HT_{2B} receptor agonists. Therefore, the mechanism responsible for the pathogenesis of PAH and valvulopathy by these drugs is likely a result of an "off-target" effect via activation of 5-HT_{2B} receptor¹⁻⁵.

PAH is a rare but fatal disease characterized by increased mean pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance due to marked pulmonary vascular remodeling that impedes the cardiac output due to progressive right heart failure. Genetic studies have shown that bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII) signaling plays a critical role in the pathogenesis of heritable PAH^{6,7}. However, pedigree studies of PAH families have shown that only 20% of people carrying a heterozygous *BMPR2* mutation will develop PAH⁸. The molecular mechanisms governing the low penetrance in heritable PAH cases are still unknown. These genetic data suggest that heterozygous *BMPR2* mutations are by themselves insufficient to account for the clinical manifestation of PAH, supporting that multiple "hits" play a pivotal role in triggering the

disease. Work is currently under way to search for modifier genes of inheriting PAH or enhancing disease susceptibility. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are gene variants that differ by a single alternative nucleotide. SNP variants for PAH-relevant genes (including the genes coding for the serotonin transporter SERT, Kv1.5, and TRPC6) may predispose to PAH but none has been yet associated with drug-induced PAH⁹⁻¹¹.

Drugs like anorexigens have been associated with a dramatic increase in the prevalence of PAH; in the 1980s and 1990s, the prolonged use of fenfluramine and dexfenfluramine increased up to 20 fold the risk of developing PAH¹², when use lasted more than three months, irrespective of the body-mass index. Fenfluramine derivatives-induced PAH shares clinical, functional, hemodynamic and genetic features with idiopathic PAH¹³. However, susceptibility factors are likely to play a part, considering the rarity of drug-induced PAH. The estimated annual incidence of PAH is on the order of 1 case per 500,000 inhabitants, the corresponding absolute risk for persons who used fenfluramine derivatives for more than three months was around 1 case per 10,000. Since only an extreme minority of patients exposed to appetite suppressants develops PAH, the need of other predisposing factors, such as genetic susceptibility, has to be postulated, with fenfluramine derivatives and 5-HT_{2B} receptor agonists acting adversely only in those predisposed subjects.

Response to pharmacologic drugs is genetically complex. It may result from interplay of multiple genomic variations with environmental influences, and depends on the functional expression of gene products, which are direct drug targets or indirectly modify the pathophysiology critically involved in their effects. In the present study, we looked for susceptibility gene associating anorectic drugs (fenfluramine derivatives) and PAH. In a first approach, we assessed a putative presence of alleles in *HTR_{2B}* gene in fenfluramine derivatives-induced PAH and idiopathic PAH occurring in patients with no history of anorexigen exposure. Strikingly, we found coding 5-HT_{2B} receptor polymorphisms in the N-terminus segregating with anorexigens-induced PAH patients. Functional consequences of these polymorphisms were evaluated by pharmacological studies combined with molecular modeling. This work reveals these susceptibility alleles as gain of 5-HT_{2B} receptor functions, identifying patients who are at risk of developing fenfluramine derivatives-induced PAH.

Methods

Patients

We reviewed data from patients with idiopathic or heritable PAH and anorexigen (fenfluramine derivatives)-induced PAH, seen within the French PAH Referral Centre (Université Paris-Sud 11, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France) between 1997 and 2011. Idiopathic PAH corresponds to sporadic disease, without any family history of PAH, mutation in PAH predisposing genes or known triggering factor. The term “heritable” PAH described PAH occurring in a familial context or when germline mutations in PAH predisposing genes (predominantly in *BMPR2* gene) were identified¹⁴⁻¹⁷. Patients with conditions associated with PAH (connective tissue diseases such as systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus, HIV infection, portal hypertension, congenital heart diseases, schistosomiasis, chronic haemolytic anaemia) were excluded from the analysis. Hemodynamic evaluation by right heart catheterization was performed at baseline in all subjects according to our previously described protocol^{18,19}. PAH was defined as a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg associated with a normal pulmonary capillary wedge pressure (PCWP). A non-encouraged 6-minute walk test according to the American Thoracic Society recommendations was performed²⁰. Patients tested for *BMPR2* mutations signed written informed consent and underwent genetic counselling. All clinical characteristics at PAH diagnosis and follow-up were stored in the Registry of the French PAH Network²¹. This Registry was set up in agreement with French bioethics laws (French Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés), and patients gave their consent to be included^{22, 23}. For *HTR2B* screening, 100 sex- and age-matched control samples were from the European NEMO family cohort²⁴.

Screening of *BMPR2* and *ACVRL1* mutation

Human genomic DNA was prepared from whole blood samples. Amplification of the entire coding sequence and intronic junctions of *BMPR2* gene was performed on 50 ng of genomic DNA from each individual. Genetic variation and large rearrangement of *BMPR2* sequence were detected as previously described²³. No patient had a personal or familial history of hereditary hemorrhagic telangiectasia and none carried a *ACVRL1* mutation.

Screening of 5-HT_{2B} receptor variant

It has been achieved by PCR amplification (one 10 min cycle at 94°C, thirty-five 30 s cycles at 94°C, 30 s at 55°C for exon 2 or 60°C for exons 3 and 4, 45 s at 72°C and one 10 min cycle at 72°C) and direct sequencing of the three coding exons of HTR2B on a 3130 Applied Biosystems material, using Applied Biosystems reagents and according to the manufacturer's instructions.

<i>HTR2B</i>	forward primer	reverse primer	Hybridation temperature
Exon 2	5'CTTTGGCTTTTGAGTGTTCG 3'	5'TAGTTCTGTGGTTTGATGGCA3'	60°C
Exon 3	5'CACCTGAAAACTGTAGACTG3'	5'TATGTTTTAGAAAGGCGTATGA3'	58°C
Exon 4	5'TTTATCTTGTTTTCTCTTCC3'	5'TATTCTTGGCACATTTACATC3'	58°C

Statistic Analysis

We compared demographic and clinical features between idiopathic and heritable PAH patients and anorexigen associated PAH patients with the use of Chi-2, unpaired t-test, Mann-Whitney, as appropriate. A p value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Homology modeling

The 3D model of the whole 5-HT_{2B} receptor used in this study was built by adding the extracellular N-terminal segment to the transmembrane helix bundle putative model previously described by Manivet *et al* ²⁵. Construction of the N-terminal segment of the human 5-HT_{2B} receptor was obtained in various steps by using the homology modeling technique.

Secondary structure predictions were achieved by using various different algorithms of prediction: DSC²⁶, DPM²⁷, GORI²⁸, III²⁹ and IV³⁰, HMMER³¹, SIMPA96³², PHD³³, PREDATOR³⁴ and SOPM³⁵. A consensus prediction of secondary structure elements was assigned to the primary sequence of the 5-HT_{2B} receptor (**Supplementary Fig. S1**) and the lengths of secondary elements were adjusted, based on helix capping studies³⁶⁻⁴⁰.

The 3D structure prediction was performed by using the Phyre web server⁴¹. Among the different heptahelical membrane receptors X-ray structures available in the Protein Data Bank, none was suitable as 3D template for the 5-HT_{2B} receptor N-terminal

segment since its, sequence, particularly its length, is far related to those of other GPCRs. Anyhow, the Phyre server succeeded to find a 3D homology with the nuclear receptor coactivator 160 (P160)⁴² (**Supplementary Fig. S1**). The 3D alignment was then refined by adjusting primary sequence gaps and secondary structures homology between the 5-HT_{2B} receptor N-terminal segment and P160.

Molecular dynamics simulations

The newly generated 3D putative model of the N-terminal segment was linked to the 3D model of the whole 5-HT_{2B} receptor, and then the whole receptor was embedded in a 32 Å wide phospholipid bilayer membrane composed of palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) (**Supplementary Fig. S2**). The receptor was further anchored to the membrane via a C397 palmitoylation. Then, solvation of the system was achieved with a pre-equilibrate orthorhombic water box with a 15 Å hydration layer of TIP3P water molecules without any water molecules placed closer than 1.8 Å to any protein or lipid atom. The electroneutrality was achieved through the addition of the appropriate number of counter ions. The minimization stage included sequential cycles of Steepest Descent and Adopted Basis Newton-Raphson algorithm. The non bonded interactions were computed with a 13 Å spherical cut-off (CUTNB) along with the FSHIFT option. A constant temperature/pressure simulation (1 atm) with a 0.001 ps time step under Leapfrog Verlet integrator was performed under the following protocol: heating to 310 K in 30 ps, kinetic energy equilibration for 200 ps and a 2 ns production run.

The positioning of the N-terminal part was achieved through application of a NOE constraint applied in the heating phase between the guanido carbon of the arginine 6 and the b-carbon atom of two residues bearing acidic function in the 5-HT binding site: Asp135 and Glu363. The entire N-terminal segment was kept as a semi rigid body during the docking process in order to avoid alteration of its structure along the MD simulations. After docking, relaxation of the N-terminal segment was achieved through molecular dynamics (MD) simulations performed with the CHARMM molecular mechanics package⁴³.

Molecular biology

Human 5-HT_{2B} receptor cDNA was subcloned into P513 vector, a derivative of the pSG5 mammalian expression vector⁴⁴ which replicates in SV40 antigen T-transformed cells and drive 5-HT_{2B} receptor expression under control of the CMV promoter. 5-HT_{2B} receptor punctual mutants were obtained by using site-directed mutagenesis kit

Quickchange II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's protocol and the N-terminal truncated 5-HT_{2B}R mutant was generated by PCR mutagenesis. TM1 constructs carrying different N-terminal sequence were obtained from each full construct by removing a PstI digest fragment (from nucleotide 258 to the end of the 5-HT_{2B} receptor cDNA sequence).

Cell culture

Cos 7 cells were cultured as monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (*Gibco, Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of Fetal Calf Serum (*Biowest*) and 5% of Penicilin/Streptomycin antibiotics (*Sigma, St Louis*, MO, USA), in 10 cm dishes (*Falcon*). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were 80% confluent when transfected with 10 µg of DNA using Nanofectin (*PAA*), according to the manufacturer's protocol, in an antibiotic-free medium. Four hours later, medium was replaced by fresh medium. 24h after transfection, cells were trypsinated (*Trypsin 1X 0.05% EDTA, Invitrogen*) and plated onto polylysine-coated 24-well plates for IP Accumulation Assays and for Whole Cell Radioligand Binding Experiments.

[³H]-Thymidine incorporation assay

It was performed as previously described⁴⁵.

[³H]-Radioligands and drugs

[³H]-Myo-Inositol (51.0 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), [³H]-Mesulergine (99 Ci/mmol) by Amersham/GE Healthcare, 5-Hydroxytryptamine (5-HT), (±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) and Nor-(+)-Fenfluramine (NDF) by Sigma, (+)-Fenfluramine (DF) by Tocris, Mesulergine by RBI research ; and (±)-3,4Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by Lipomed.

³[H]Inositol Phosphate accumulation assays

24h before the experiment, cells were incubated in 24-well plates overnight with 20 nM of [³H]-Myo-Inositol diluted in an inositol-free medium (*BME, Lonza*, Basel, Switzerland). Just before receptor stimulation, medium was replaced by Krebs-Ringer-Hepes buffer (130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, pH=7.4) supplemented with 20 mM LiCl to prevent IP₁ degradation. Cells were stimulated in duplicate in a final volume of 500 µl for 1h.

Experiment was stopped by replacing the stimulation medium by 10^{-3} M formic acid at room temperature for 20 min, and at 4°C overnight. Thus IP₁, accumulated from IP₃ and IP₂ hydrolysis, was released from lysed and fixed cells. The accumulated IP₁ was eluted on anion exchange column (*Bio-Rad AG-1X8, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA*) with 0.2 M ammonium formate in 0.1 M formic acid. Scintillation cocktail (Ultima Gold XR, Perkin Elmer) was added to the eluted [³H]-IP₁ sample and radioactivity was counted in a Beckman scintillation counter. Data obtained in dpm were analysed on Graphpad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA), converted in fmoles and normalized by the amount of proteins and the number of receptor sites (Bmax) obtained in whole cell radioligand binding experiments.

Whole Cell Radioligand binding assay

24h before experiment, cells were incubated in serum-free medium overnight. The next day, medium was replaced by 400µl/well of Krebs-Ringer-Hepes buffer (130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, pH=7.4). 50 µl of [³H]-labelled compounds were diluted in Krebs-Ringer-Hepes buffer, at a final concentration between half the K_d and the K_d for the 5-HT_{2B} receptor. The tritiated radioligand was competed by 50 µl of increasing concentrations of non-radioactive ligand also diluted in Krebs-Ringer-Hepes buffer. Cells were then incubated for 30 min at room temperature and were finally washed on ice, two times with cold PBS and lysed by addition of 500 µl of SDS 1%. The next day, 4 mL of scintillation cocktail were added to the samples and the radioactivity was counted using a scintillation counter (Beckman coulter). Data in dpm were converted in fmoles and normalised by the amount of proteins.

Immunocytochemistry

Cos cells, plated on coverslips and transfected with either the TM-N-terminus (TM-WT or TM-R6G/E42G) constructions or the Mock (TM-ΔNter), were incubated overnight in serum-free DMEM before immunocytochemistry experiments. Then, cells were washed 3 times with cold PBS and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde. After 3 washes with PBS + BSA 3% without permeabilization, cells were incubated at room temperature for 4 hours with a rabbit antibody against the N-terminus of the 5-HT_{2B} receptor (1:1000) (PharMingen). After 3 washes with PBS+BSA (3%), the primary antibody was

revealed by 1 hour incubation with a goat-anti-rabbit antibody coupled to Alexa 488. After 3 washed, coverslips were mounted with mowiol.

Results

Patient population

We reviewed data from 91 PAH patients, including 56 idiopathic or heritable PAH patients and 35 drug-induced PAH patients (32 exposed to fenfluramine derivatives, 9 exposed to amphetamines, and 1 exposed to cocaine and heroin) (**Table 1**). PAH patients exposed to anorexigens were significantly older at diagnosis than idiopathic and heritable PAH patients (46.9 ± 11.6 and 38.8 ± 12.7 respectively, $p < 0.005$). However, these 2 groups of patients had broadly similar hemodynamic characteristics (mPAP, PWCP, cardiac index (CI), cardiac output (CO), pulmonary vascular resistance (PVR)) (**Table 1**). As previously reported, we observed an over-representation of women in PAH patients exposed to anorexigens compared to idiopathic or heritable PAH patients (female/male sex ratio of 16.5 and 2.3 respectively, $p < 0.01$). Patients exposed to anorexigens had a higher body mass index compared to patients with idiopathic or heritable PAH (24 ± 4 versus 28 ± 6 kg/m², $p = 0.0001$) and a lower 6 minute walk distance (256 ± 152 versus 338 ± 150 m, $p < 0.05$) (**Table 1**). Moreover, 39 patients were tested for BMPR2 mutations (34 idiopathic PAH patients and 5 drug-induced PAH). A BMPR2 mutation was identified in 16 PAH patients non-exposed to anorexigens (47%) and in one exposed patient (20%).

Presence of a *HTR_{2B}* variant (R6G, E42G) in a human cohort of PAH patients

A *HTR_{2B}* molecular screening was performed in the cohort study composed of 91 PAH patients and 100 matched healthy controls. The result showed the presence of polymorphisms in the N-terminal part of the 5-HT_{2B} receptor (**Table2, Fig. 1a**). In this PAH population, we found high occurrence of a double polymorphism in the *HTR_{2B}* sequence. At the genomic level, this polymorphism is composed of two nucleotide substitutions resulting in the exchange of an arginine (R6) and a glutamic acid (E42) by glycine residues (**Fig.1b**). This R6G/E42G variant was found homozygous in 13.2 % and heterozygous in 4.4 % of the patients, compared to the control population (0 % and 1 % respectively) (**Fig. 1a**). Contrarily to the PAH patients, 94 % of the control population had a wild type sequence vs. 76 % in PAH patients. Remarkably among the 91 PAH

patients, 35 patients (38.5 %) had taken the now-banned anorexigens fenfluramine derivatives. Further investigation revealed that among those 35 fenfluramine derivatives users in the PAH population, only 40 % had a wild-type *HTR_{2B}* sequence whereas 60 % had a polymorphism: 34.3 % homozygous R6G/E42G, 14.3 % homozygous R6G and 11.4 % heterozygous R6G/E42G (**Table 2**). For those variants, a significant difference in distribution in PAH patients having received fenfluramine derivatives or not was found ($\chi^2=24.2$, $df=1$, $p<0.001$, odds ratio=51.9 [95% confidence interval=6.452-418]). The presence of this allele was associated with the DF intake compared with the WT allele ($\chi^2=43.0$, $df=1$, $p<0.001$, odds ratio=46.2 [95% confidence interval=9.832-218]). These results indicate that in the PAH population, the presence of a polymorphism in the *HTR_{2B}* sequence is statistically correlated to the use of fenfluramine derivatives.

The N-terminal variant R6G/E42G acts as a gain of proliferative functions

Because it was not possible to study the mutated R6G/E42G receptor in patient native tissues, we used transfected COS-7 cells. We first explored whether this polymorphism in the N-terminal sequence modifies the proliferative function of the 5-HT_{2B} receptor based on thymidine incorporation (**Fig. 2a**). Interestingly, in response to 1 μ M 5-HT, the R6G variant incorporated 2-fold more thymidine, while the R6G/E42G variant nearly reached 5-fold increase compared to WT. It is noteworthy that these two variants are the most frequently found in PAH cohort (**Table 2**). By contrast, the E42G variant, which was not observed in the PAH population, showed no significant difference in thymidine incorporation, compared to the WT receptor. We then assessed the pharmacological properties of this variant through radio ligand binding assay. Homologous competition experiments showed a left shift in the displacement curve for 5-HT meaning that the 5-HT_{2B} variant receptor had a 5-fold increase in affinity for 5-HT (**Fig. 2b**), i.e. a 4-fold decrease in K_i for the R6G/E42G ($P<0.05$) variant. For the selective agonist, BW 723C86, affinity increased for the R6G/E42G variant more than 4-fold compared to the WT (**Supplementary Table S1**). Finally, a similar trend was found for the 5-HT₂ agonist DOI with a 2.4-fold drop in K_i for the variant receptor. Affinities for all tested antagonists were not modified (**Supplementary Table S1, Supplementary Fig. S3a**).

The R6G/E42G variant activates G protein more efficiently

We then explored the variant impact on an immediate effector of the 5-HT_{2B} receptor, the Gq/11 coupling pathway, which promotes the activation of phospholipase C (PLC) and leads to membrane inositol triphosphate (IP) hydrolysis. First, without agonist stimulation, the R6G/E42G variant receptor accumulated 40% more IP than the WT receptor ($p < 0.001$) (**Supplementary Fig. S3b**). In a dose response curve, increasing concentrations of a 5-HT₂ agonist, DOI, activated the R6G/E42G variant more efficiently than the WT receptor, leading to about 40% increase of both minimal (E_{min}) and maximal (E_{max}) IP accumulated as well as activation efficiency (E_{max}-E_{min}), with an unchanged EC₅₀ (**Fig. 2c**). According to their respective EC₅₀ (**Supplementary Fig. S3c**) all the agonists tested activated the variant receptor more efficiently than the WT receptor (+ 25% for 5-HT, $p < 0.05$; + 17% for DF, $p < 0.01$; + 20% for NDF, $p < 0.05$; + 21% for DOI, $p < 0.001$ and + 30% for MDMA, $p < 0.05$) (**Fig. 2d**). Taken together, these results indicate that the human R6G/E42G polymorphism associated with the use of DF in PAH patients, leads to a more efficient coupling of the 5-HT_{2B} receptor.

Direct interaction of the N-terminal domain with the 5-HT-binding site

In order to understand the increased coupling observed for the N-terminal variants, a molecular modeling study was performed. The N-terminal segment putative 3D model obtained by homology modeling contains four helices: H0, H1, H2 and H3 (**Fig. 3a**, **Supplementary Fig. S1b**). After MD simulations, H0 and H3 were highly flexible. Upon docking to the receptor binding site, H0 shortened and then changed to a random coil conformation. H1 and H2 remained unchanged and were stabilized by intramolecular interactions (**Fig. 3a**). A strong network of ionic interactions, between K53 and four negatively charged residues *i.e.* E37, E42, E48 and E49, stabilized H2 folding through an ionic capping box at its N- and C-terminal edges and allowed a proper presentation of H1 and H0 to the agonist binding site. In this latter site, R6 strongly interacted with the two negative acidic residues D135 and E363 (**Fig. 3b**). In addition, two salt bridges were established between E9 and E16 (H0 and H1 respectively) and K211 and R213 (ECL2) respectively, and remained stable during the whole course of the MD trajectory.

Validation of N-terminal domain interactions by site-directed mutagenesis

In order to correlate molecular modeling observation to pharmacological data, an experimental validation of the 5-HT_{2B} receptor 3D model was performed by site-directed mutagenesis. Various amino acid substitutions have been selected in order to evaluate the contribution of critical amino acid loci to the receptor activation (**Supplementary Fig. S4**). The affinity for 5-HT of M1 (K211S; R213D), M5 (G37K; E42K K53E) or N-terminal deletion of the first 32 amino-acids (Δ Nter) mutants was increased compared to WT (K_i values for M1 and M5 2-fold increase; Δ Nter 5-fold) (**Supplementary Fig. 3d**). K_i and E_{max} IP levels for M2 (E16S), M3 (E9S) and M4 (E37S; E42S; K53S) were not substantially different compared to the WT (**Supplementary Fig. 4b**). For IP basal activity, the most important increase was seen for M1 (275 %), Δ Nter (238 %) and M5 (190 %). The agonist-induced IP accumulation followed the same trend than the basal Gq/11 coupling with a noticeable increase for M1, M5 and Δ Nter mutants (M1 and Δ Nter 150 %; M5 130 %). It is worth noting that the IP responses for the different mutants (**Supplementary Fig. 4b**) and for the variant (**Fig. 2d**) were significantly increased for DF and its metabolite NDF, implicated in PAH. These results led to us to conclude that the ECL2/Nter interactions are of major importance in the control of G protein coupling. The E to S mono amino-acid substitutions in M2 and M3 had less impact on receptor efficacy than the double mutant M1: E9 or E16 could compensate each other upon substitution by interacting with the couple of positively charged residues K211 and R213. On the other hand, the M1 double mutation abolished the interactions between the N-terminal segment and both K211 and R213. The effect of serine substitutions at loci E9 and E16 suggests that strong ionic interactions are mandatory to account for the interaction between the N-terminal segment and ECL2 in order to promote an allosteric regulation, an hydrogen bond being too weak to be efficient.

A similar interpretation can be applied for explaining the differences in efficacy (IP level) between M4 and M5. Strong ionic interactions between E37, E42 and K53 are necessary for proper folding of the N-terminal segment, compatible with optimal signaling functions. The substitutions in M4 still allow interactions through a network of hydrogen bonds, whereas in M5 substitution by repulsive charges completely prevents N-terminal interactions with the rest of the receptor. Finally, similar effects on Gq/11 coupling for the variant and for the N-terminal deletion mutants suggested that the two

amino-acid substitutions found in PAH patients are sufficient to abolish the N-terminal control function. So far, the results obtained support a role of the N-terminal in the control of basal activity as well as in activation of the receptor.

Validation of N-terminal domain interactions in tissue culture cells

Further evidences for a major role of the N-terminal segment in receptor function were obtained with a dual genetic construction: the first transmembrane domain of the 5-HT_{2B} receptor (TM1) tethered to various N-terminal sequences was co-transfected with various modified receptors (**Fig. 4**). The hypothesis was that the TM1-WT N-terminal could reduce to WT levels, the increased activity observed for truncated N-terminal receptors by an intermolecular action. The functional impact of each combination of receptors was measured through IP accumulation after agonist stimulation (**Fig. 4**). As expected, when co-transfected with a WT full length receptor, the different TM1 constructs did not modify IP levels, as compared to the WT control. When the R6GE42G full length receptor was co-transfected with a TM1-ΔNter construct lacking the final 32 amino acids of the N-terminal, the IP accumulation was increased up to 125 % of agonist-induced WT level as previously described for the variant receptor. Thus this N-terminus-deleted TM1 construct (TM1-ΔNter) did not prevent the increased IP level. Increase of IP level was also significant in the chimeric construct totally lacking any N-terminal fragment (ΔNter + TM1-ΔNter), as previously observed for the full length ΔNter receptor. However, when the full length receptor lacking the N-terminus (ΔNter) was co-transfected with a TM1 construct carrying the WT N-terminus (TM1-WT), the IP level was significantly decrease to WT level. This result indicates that tethered expression (**Supplementary Fig. S3e**) of a WT N-terminus (TM1-WT) is able to reverse the increase of IP level due to the N-terminus deletion of the full length receptor (ΔNter), and thus, to restore the WT activity of truncated receptor in a *trans* physical interaction. Nevertheless, IP levels were also increased (>125% WT level) when the ΔNter receptor was co-transfected with a TM1 construct carrying the variant mutation (TM1-R6GE42G). The impossibility for this TM1-R6GE42G fragment to functionally compensate the lack of N-terminal in the receptor clearly demonstrates the loss of N-terminus functionality in the variant receptor. In summary, this lack of N-terminus-mediated control of receptor activation generates a gain of function of the variant 5-HT_{2B} receptor.

Discussion

In the present study, we report a functional study on *HTR_{2B}* polymorphisms associated with PAH in patients having been exposed to fenfluramine derivatives. We show that these coding *HTR_{2B}* polymorphisms modify one or two amino acids (R6G, R6G/E42G) at the N-terminus of the receptor. Among patients with fenfluramine derivatives-induced PAH, 60% showed *HTR_{2B}* polymorphisms and among them R6G/E42G homozygous (57%) and R6G homozygous state (24%), while the control population displayed only heterozygous polymorphisms. Strikingly, all PAH patients that carried homozygous *HTR_{2B}* polymorphism, except one homozygous R6G (amphetamine group), had a history of dexfenfluramine derivatives use. It was previously shown that 5-HT_{2B} receptor activation is a limiting step in the development of PAH, as 5-HT_{2B} antagonists PRX-08066, terguride, C-122 or RS-127445 reduce pulmonary artery pressures in rodent models of pulmonary hypertension such as monocrotaline exposed rats^{46–48} or hypoxic mice⁴⁹. In addition, 5-HT_{2B}^{-/-} mice are resistant to hypoxia-induced pulmonary hypertension⁴⁹. Furthermore, although first identified as a loss of G_{αq/11} coupling⁵⁰, an heterozygous R393X polymorphism of the *HTR_{2B}* identified in a single patient that developed PAH after anorexigens exposure was further demonstrated to associate with a strong gain of efficacy in cell proliferation due to an increased G_{α13} coupling⁴⁵.

We show that the R6G/E42G variant of the 5-HT_{2B} receptor is a gain of affinity linked to a more efficient coupling of the receptor as highlighted by an increase of 5-HT-induced cell proliferation and also an increased E_{max} of agonist-induced PI hydrolysis. According to pharmacological studies coupled to molecular dynamics studies on a putative 3D model of the human 5-HT_{2B} receptor containing the N-terminus, we describe an original folding pattern structured in two main alpha helices, bearing in mind that even if homology modeling shows many limitations, it can however help to drive experimental investigations for deciphering complex allosteric regulations. The interaction between the N-terminal segment and D135, a key residue for optimal agonist affinity and efficacy²⁵, is reinforced by its interaction with residues K211 and R213 located on ECL2. These N-terminus/ECL2 contacts maintain the 5-HT_{2B} receptor in a metastable conformation with a reduced ability to couple to G proteins. Indeed, the N-terminus-truncated human 5-HT_{2B} receptors are more efficiently coupled to G proteins. This gain of function can be prevented by re-expression of a single transmembrane

domain carrying the N-terminus extremity (*trans*). Therefore, our results show that the human R6G/E42G variant receptor having lost its N-terminus interactions with the 5-HT binding site leads to a gain of coupling efficiency both in basal and stimulated conditions. We previously demonstrated that electrostatic interaction between D100 (TM2) and N376 (TM7) residues plays a pivotal role in 5-HT_{2B} receptor constitutive activity and agonist efficacy²⁵. N376 is belonging to the well known N-P-X-X-Y motif like Y380, a conserved sequence in rhodopsin-like G-protein coupled receptors. It is interesting to note that in our putative 3D model of the human 5-HT_{2B} receptor, the Y380 side chain is strongly interacting with D100 and N376 residues^{25,51} when the N-terminus is bound to the helix bundle, that is not the case when the N-terminus is truncated. The N-terminus could possibly allow an allosteric switch of the 5-HT_{2B} receptor conformation from a metastable (lower agonist affinity, low coupling capacity and low constitutive activity) to an activated one by acting on the Y380 side chain.

Few studies have evidenced a role for the N-terminus in the function of Rhodopsin-like GPCR (class A). Deletion of the N-terminus impairs constitutive activity of GPR61 receptors that could be restored by adding a fusion protein containing a CD8 single transmembrane domain carrying the N-terminus (*trans*)⁵². An interaction between the N-terminus and the third extracellular loop (ECL3) of CXCR4 and C5aR has also been implicated in an activation micro-switch region: whereas the N-terminus/ECL3 interaction stabilizes the active state of CXCR4, it acts as an inverse agonist in C5aR possibly by making multiple contacts with the TM domains to stabilize the inactive state⁵³. Furthermore, the histamine H1 N-terminus interacts with the ECL2 to influence receptor pharmacology by contributing to ligand binding, receptor activation, and agonist selectivity⁵⁴. It is noteworthy that the ECL2 of histamine H1, 5-HT_{2B} and the muscarinic M1 receptors has the same particular architecture, making helices directly above the binding site⁵⁵. The new 5-HT_{2B} receptor 3D model provides new insights in the role of N-terminus and ECL2 in aminergic receptors signaling. Further investigations are necessary to fully understand the contribution of the N-terminus in other aminergic receptors function. Given that activation of 5-HT_{2B} receptors is required to fenfluramine derivatives-induced PAH⁴⁹, such a gain of 5-HT_{2B} receptor function could maximize the risk of developing PAH after drug exposure. Therefore, overconsumption of these amphetamine-like anorexigens could finally lead to an overstimulation of the 5-HT_{2B} receptor signaling pathway that promotes an increased risk of developing PAH.

Comparing results from unrelated individuals who had substantial histories of illegal drug use and/or dependence with results from matched samples of individuals who have no significant lifetime use of any addictive drug, a genome-scan identified *HTR_{2B}* as a candidate for drug abuse vulnerability⁵⁶. Three variants were revealed in exon 2 (the first coding exon) resulting in double-missense mutations R6G and E42G, respectively⁵⁶. We identified here identical variants, although segregating with fenfluramine derivatives-induced PAH, raising the question of putative links between these observations. Fenfluramine derivatives as anorectic compound were removed from the market at the end of the 1990's because of cardiovascular side-effects including cardiac valvulopathy and PAH. Besides its weight-loss properties, a possible recreational use of fenfluramine-derivatives has been described⁵⁷ since it is effective in reducing anxious-depressive symptomatology in humans⁵⁸. Abuse of fenfluramine derivatives by subjects with a history of other drug abuse has been reported associated with euphoria, derealization, and perceptual changes⁵⁹. In an obese patient without drug abuse history, low dose of fenfluramine derivatives was associated with unpleasant effects as nausea, vomiting, dizziness, and drowsiness, while high dose produced euphoria, hyperactivity, reduced sleep, increased appetite and libido⁶⁰. In healthy volunteers, similar dose triggers hallucinogenic episodes, abrupt polar changes in mood, time distortion, fleeting paranoia, and sexual ideation⁶¹, suggesting that fenfluramine derivatives could be a psychotropic agent. Administration of fenfluramine derivatives to rats at anorectic doses appears devoid of central stimulant activity^{62,63}, even if amphetamine-like locomotor effects has been observed⁶⁴. It remains thus possible that, in humans, fenfluramine derivatives may not be a recreative drug because of unpleasant initial effects, but can be drug of dependence as depressive mood occurs about four days after withdrawal⁶⁵. Because Lin *et al*⁵⁶ have proposed that such a *HTR_{2B}* variant could predispose to drug abuse and studies have found a putative recreational use of fenfluramine derivatives, we cannot rule out the possibility that these *HTR_{2B}* polymorphisms are related to misuse of fenfluramine derivatives, although under medical prescription: individuals that carry the *HTR_{2B}* gain-of-function variant may have primarily a behavioral predisposition to fenfluramine derivatives abuse, like anxiety, depressive symptoms or mood disorders.

Response to pharmacologic drugs is genetically complex, may result from interplay of multiple genomic variations with environmental influences. In the present study, we identified a gene variant strongly associating fenfluramine derivatives anorexigens and

PAH. The presence of alleles in *HTR_{2B}* segregating with fenfluramine derivatives-induced PAH patients, that code for altered N-terminus identifies these susceptibility alleles as gain of 5-HT_{2B} receptor functions. Furthermore, this polymorphism clearly defines patients who are at risk of developing fenfluramine derivatives-induced disease. Quite few functional polymorphisms have been identified in drug-induced diseases. Benfluorex has been recently found associated with valvulopathy and PAH (up to 50% of the cases)⁶⁶. Whether 5-HT_{2B} receptor polymorphisms is associated with similar class of drug-induced valvular heart disease remains to be established. However, it is unlikely that this *HTR_{2B}* polymorphism is the only susceptibility gene in these diseases. Anyhow, screen for the presently identified polymorphisms might eliminate a fairly high amount of patients at risk of fenfluramine derivatives-associated PAH and as such has high predictive value.

References

1. Fitzgerald, L.W. *et al.* Possible role of valvular serotonin 5-HT_{2B} receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* **57**, 75-81 (2000).
2. Roth, B.L. Drugs and valvular heart disease. *N. Engl. J. Med.* **356**, 6-9 (2007).
3. Rothman, R.B. & Baumann, M.H. Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opin. Drug. Saf.* **8**, 317-329 (2009).
4. Rothman, R.B. *et al.* Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**, 2836-2841 (2000).
5. Setola, V. *et al.* 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, « Ecstasy ») induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1223-1229 (2003).
6. Machado, R.D. *et al.* BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 92-102 (2001).
7. Sztrymf, B. *et al.* Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1377-1383 (2008).
8. Newman, J.H. *et al.* Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 33S-39S (2004).
9. Wipff, J. *et al.* Association of a KCNA5 gene polymorphism with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the European Caucasian population. *Arthritis Rheum.* **62**, 3093-3100 (2010).
10. Eddahibi, S. *et al.* Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **108**, 1141-1150 (2001).
11. Yu, Y. *et al.* A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **119**, 2313-2322 (2009).
12. Weir, E.K., Obreztschikova, M. & Hong, Z. Fenfluramine: riddle or Rosetta stone? *Eur. Respir. J.* **31**, 232-235 (2008).
13. Souza, R. *et al.* Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur. Respir. J.* **31**, 343-348 (2008).
14. Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, S43-54 (2009).
15. Galiè, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **34**, 1219-1263 (2009).
16. Galie, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* **30**, 2493-2537 (2009).
17. Montani D, *et al.* Implementing the ESC/ERS pulmonary hypertension guidelines: real-life cases from a national referral centre. *Eur. Respir. Rev* **18**(114), 272-90 (2009).
18. Sitbon O. *et al.* Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: Prognostic factors and survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**(4), 780-88 (2002).
19. Sitbon, O. *et al.* Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **111**, 3105-11 (2005).
20. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2002

21. Humbert, M. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **173**, 1023-30 (2006).
22. Humbert M, *Am J Respir Crit Care Med* (2006)
23. Girerd, B., *et al.* Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**(8), 851-61
24. Cohen-Solal ME, Baudoin C, Omouri M, Kuntz D, De Vernejoul MC. *Bone mass in middle-aged osteoporotic men and their relatives: familial effect.* *J. Bone Miner. Res.* **13**(12), 1909-14 (1998)
25. Manivet, P. *et al.* The serotonin binding site of human and murine 5-HT_{2B} receptors: molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 17170-17178 (2002).
26. King, R.D. & Sternberg, M.J. DSC: public domain protein secondary structure predication. *Comput. Appl. Biosci.* **13**, 473-474 (1997).
27. Deléage G. & Roux, B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* **1**, 289-294 (1987).
28. Garnier J. Osguthorpe, D.J. & Robson, B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120 (1978).
29. Gibrat, J.F., Garnier, J. & Robson, B. Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J. Mol. Biol.* **198**, 425-443 (1987).
30. Garnier, J., Gibrat, J.-F. & Robson, B. GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology R.F. Doolittle Ed.* **266**, 540-553 (1996).
31. Eddy, S.R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**, 755-763 (1998).
32. Levin, J.M., Robson, B. & Garnier, J.A. An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.* **205**, 303-308 (1986).
33. Rost, B. & Sander, C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**, 584-599 (1993).
34. Frishman, D. & Argos, P. Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9**, 133-142 (1996).
35. Geourjon, C & Deleage, G. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng.* **7**, 157-164 (1994).
36. Rajeev, A. & Rose, G.D. Helix capping. *Protein Sci.* **7**, 21-38 (1998).
37. Kumar, S. & Bansal, M. Dissecting α -Helices: Position-Specific Analysis of α -Helices in Globular Proteins. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **31**, 460-476 (1998).
38. Petukhov, M. *et al.* Factors that affect the stabilization of α -helices in short peptides by a capping box. *Biochemistry* **35**, 387-397 (1996).
39. Petukhov, M. *et al.* Position Dependence of Non-polar Amino Acid Intrinsic Helical Propensities. *J. Mol. Biol.* **278**, 279-289 (1998).
40. Seale J.W. *et al.* Sequence determinants of the capping box, a stabilizing motif at the N-termini of α -helices. *Protein Science* **3**, 1741-1745 (1994).
41. Kelley L.A. & Sternberg, M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**, 363-371 (2009).
42. Demarest S.J. *et al.* Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* **415**, 549-53 (2002).
43. Brooks, B.R. *et al.* CHARMM a program for macro-molecular energy, minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187-212 (1983).
44. Esteve, L. *et al.* Cyclic GMP-dependent protein kinase potentiates serotonin-induced Egr-1 binding activity in PC12 cells. *Cell. Signal.* **13**, 425-432 (2001).

45. Deraet, M. *et al.* The natural mutation encoding a C terminus-truncated 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor is a gain of proliferative functions. *Molecular Pharmacology* **67**, 983 (2005).
46. Dumitrascu, R. *et al.* Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.* **37**, 1104-1118 (2011).
47. Porvasnik, S.L. *et al.* PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 364-372 (2010).
48. Zopf, D.A. *et al.* C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT_{2B}, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **670**, 195-203 (2011).
49. Launay, J.-M. *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* **8**, 1129-1135 (2002).
50. Blanpain, C. *et al.* Serotonin 5-HT_{2B} receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res* **60**, 518-528 (2003).
51. Rashid, M. *et al.* Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modelling. *Life Sci.* **73**, 193-207 (2003).
52. Toyooka, M., Tujii, T. & Takeda, S. The N-terminal domain of GPR61, an orphan G-protein-coupled receptor, is essential for its constitutive activity. *Journal of neuroscience research* **87**, 1329-1333 (2009).
53. Rana, S. & Baranski, T.J. Third Extracellular Loop (EC₃)-N Terminus Interaction Is Important for Seven-transmembrane Domain Receptor Function: Implications for an activation microswitch region. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 31472-31483 (2010).
54. Strasser, A., Wittmann, H.J. & Seifert, R. Ligand-specific contribution of the N terminus and E2-loop to pharmacological properties of the histamine H₁-receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 783 (2008).
55. McRobb, F.M., Capuano, B., Crosby, I.T., Chalmers, D.K. & Yuriev, E. Homology Modeling and Docking Evaluation of Aminergic G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Chemical Information and Modeling* **50**, 626-637 (2010).
56. Lin, Z., Walther, D., Yu, X.-Y., Drgon, T. & Uhl, G.R. The human serotonin receptor 2B: coding region polymorphisms and association with vulnerability to illegal drug abuse. *Pharmacogenetics* **14**, 805-811 (2004).
57. Gaine, S.P., Rubin, L.J., Kmetzo, J.J., Palevsky, H.I. & Traill, T.A. Recreational use of aminorex and pulmonary hypertension. *Chest* **118**, 1496-1497 (2000).
58. Rickels, K., Hesbacher, P., Fisher, E., Perloff, M.M. & Rosenfeld, H. Emotional symptomatology in obese patients treated with fenfluramine and dextroamphetamine. *Psychol. Med.* **6**, 623-630 (1976).
59. Levin, A. Abuse of fenfluramine. *Br. Med. J.* **2**, 49 (1973).
60. Rosenvinge, H.P. Letter: Abuse of fenfluramine. *Br. Med. J.* **1**, 735 (1975).
61. Griffith, J.D., Nutt, J.G. & Jasinski, D.R. A comparison of fenfluramine and amphetamine in man. *Clin. Pharmacol. Ther* **18**, 563-570 (1975).
62. Alphin, R.S. & Ward, J.W. Anorexigenic effects of fenfluramine hydrochloride in rats, guinea pigs, and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **14**, 182-191 (1969).
63. Le Douarec, J.C., Schmitt, H. & Laubie, M. [Pharmacologic study of fenfluramine and its optical isomers]. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **161**, 206-232 (1966).

64. Everitt, B.J., Hacket, N.B. & Rand, M.J. Proceedings: Central stimulant action of fenfluramine in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **44**, 342P-343P (1972).
65. Oswald, I., Lewis, S.A., Dunleavy, D.L., Brezinova, V. & Briggs, M. Drugs of dependence though not of abuse: fenfluramine and imipramine. *Br. Med. J.* **3**, 70-73 (1971).
66. Boutet, K. *et al.* Fenfluramine-like cardiovascular side-effects of benfluorex. *Eur. Respir. J.* **33**, 684-688 (2009).

Figures Captions

Figure 1. Molecular description of the 5-HT_{2B} receptor variant. **a.** Percentage of different sequence variation of the receptor for 95 PAH patients and 200 controls: WT, R6G, E42G, R6G/E42G. **b.** 2D localization of the major SNP found in the population. Amino acid sequence and localization of the double SNP R6G/E42G in the N-terminus of 5-HT_{2B} receptor. The 5-HT binding site residues are presented in grey and the SNP substitution position is presented in black on the N-terminal sequence.

Figure 2. Pharmacological characterisation of the R6G/E42G double SNP variant of human 5-HT_{2B} receptor. **a.** Measurement of proliferation rate by [³H] thymidine incorporation performed for the wild-type receptor, for mono-variant R6G and E42G and for the variant (SNP) R6G/E42G. Thymidine levels are normalized to WT. **b.** Exemple of radioligand binding competition experiments performed for the WT receptor and the SNP. **c.** Dose-response of agonist-induced IP accumulation show that R6G/E42G variant receptor is more efficiently coupled to G_q protein than the WT receptor when stimulated for 1 hour with increasing concentrations of DOI (from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M). **d.** Agonist-stimulated IP maximum (E_{max}) accumulation of SNP (R6G/E42G) receptor stimulated with 5-HT (10 nM), DexFenfluramine (10 μM), NorDexFenfluramine (1 μM), DOI (100 nM) and MDMA (10 μM). Results were normalized to WT level and were statistically analysed by Welch-corrected t-test. n= 5 to 6 independent experiments performed at least in duplicate. (Statistical significance: *, p< 0.05 ; **, p< 0.01 ; ***, p< 0.001 vs. WT receptor.)

Figure 3. Modeled structure of the N-terminal part of the receptor binding into the 5-HT binding site. **a.** 2D representation of the serotonin 2B receptor. The N-terminal domain is presented with the putative two alpha helices (dash line) colored in white grey (H1, H2). The three extracellular loops (ECL 1-3) connected to the seven transmembrane domain (TMD) are shown in green as well as the disulfide bond linking ECL1 and ECL2. Each TMD (1-7) is represented by a grey cylinder. The intracellular loops (ICL 1-3) and the rest of the C-terminal domain anchored to the membrane through a palmitoyl tail (blue) are colored in gray. Negatively charged residue are red colored and positively charged residue are blue colored. **b.** MD snapshot obtained for 3D model of the receptor showing the interactions of the N-terminal part with residues of the 5-HT binding site (ICLs and the C-terminal domain are not shown). **c.** Close view of the electrostatic interaction between Glu42 and Lys 53. **d.** Close view of the interaction between Arg6 (Nterm) with Asp 135 (TMD3) and Glu 363 (TMD6). The interaction between Glu9 (Nterm) and Arg213 (ECL2) is also shown. The helices are represented in ribbons and side chain of amino acids in sticks (color legend: white for carbon atom, blue for nitrogen atom and red for oxygen).

Figure 4: Functional study of different 5-HT_{2B} receptors co-expressed with a transmembrane insert: TM1 and various N-terminal parts. TM1-WT and TM1-R6G/E42G constructs are 93 amino acids long and TM1-ΔNter construct is deleted of the 32 first amino acids, i.e 61 amino acids long. The IP accumulation is measured after DOI (100nM) stimulation of WT, SNP (R6G/E42G) and ΔNter receptors. Results were normalized to WT level and were statistically analysed by one-way Anova and Bonferroni multiple comparison post-Hoc. n=3 independent experiments each performed in triplicate. (Statistical significance: *: p<0.05, **: p<0.01 vs. WT+TM1-ΔNter ; #: p<0.05, ##: p<0.01 vs. WT+TM1-WT ; §: p<0.05, §§: p<0.01 vs. WT+TM1-R6G/E42G ; \$: p<0.05 vs. ΔNter+TM1-ΔNter ; £: p<0.05 vs. WT+TM1-R6G/E42G).

Supplementary Figures Captions

Table S1: Affinity constants (K_i) for different agonist and antagonist compounds binding to SNP (R6G/E42G) 5-HT_{2B} receptor compared to WT 5-HT_{2B} receptors. Pharmacological determinations were performed on transiently transfected COS-7 cells expressing the relevant receptor by homologous and heterologous competition. Values are presented as mean ± SEM, n=5 independent experiments, each performed in triplicate.

Figure S1. Secondary structures predictions for the N-terminal 3D model. **a.** Sequence alignment between the N-terminal of the 5-HT_{2B} receptor and the P160 protein. **b.** Putative positions of the different helices present at the start of the MD simulation.

Figure S2. The solvated 3D membrane model of the 2B Serotonin receptor. **a.** The receptor is inserted in a double membrane layer. **b.** The orthorhombic box solvating the receptor is presented with a palmitoyl residue anchored to the membrane (the lipid bilayer is not shown for clarity).

Figure S3. a. Homologous antagonist competition binding (Mesulergine) shows no difference between the WT 5-HT_{2B} receptor and the SNP (R6G/E42G) 5-HT_{2B} receptor. **b.** Basal activity (E_{min}) of the SNP (R6G/E42G) receptor compared to WT 5-HT_{2B} receptor. The amount of basal IP accumulated was normalized by the amount of receptor expressed at the cell surface (B_{max}) and were converted in fold WT IP accumulation. Results were statistically analysed by two-tailed t test (n=3 independent experiments performed in triplicate, *** : p<0.001 vs. WT 5-HT_{2B} receptor). **c.** Agonist-induced IP accumulation of the WT 5-HT_{2B} receptor. Results for various agonists are expressed in percent of maximal 5-HT-induced IP accumulation. (n=3 independent experiments performed in triplicate). **d.** Example of 5-HT homologous binding competition for different 5-HT_{2B} receptor mutants used to verify the *in silico* modelisation of the 5-HT_{2B} receptor. The left-shift of the curve for the mutants show an increase of affinity for 5-HT. **e.** Immunostaining of TM1-WT construct expressed at the cell surface of COS-7 cells. Antibodies against N-terminus of the 5-HT_{2B} receptor were incubated without permeabilization to ensure the cell surface expression, compared to untransfected cells.

Figure S4. Pharmacological characterisation of various 5-HT_{2B} mutants to validate the *in silico* modelisation of the 5-HT_{2B} receptor. **a.** Details of mutated amino acids in the different mutants. Grey circles represent residues of the 5-HT binding site **b.** Characterisation of mutants Gq coupling by agonist-induced IP accumulation assay. Amount of IP accumulated were normalized by the amount of each mutant receptor at the cell surface (B_{max}) and were expressed in percent of WT IP accumulation. Results were statistically analysed by one-way Anova and Bonferroni multiple comparison post-hoc. n=3 independent experiments each performed in triplicate. (Statistical significance * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 vs. WT ; # : p<0.05, ##: p<0.01, ### : p<0.001 vs. M1 ; § : p<0.05, §§ : p<0.01, §§§ : p<0.001 vs. M2 ; \$: p<0.05, \$\$: p<0.01, \$\$\$: p<0.001 vs. M3 ; £ : p<0.05, ££ : p<0.01, £££ : p<0.001 vs. M4 ; ¢ : p<0.05 vs. M5)

Table 1: Demographic and hemodynamic characteristics of idiopathic and heritable PAH patients and anorexigen associated PAH patients.

	All PAH n=91	Idiopathic or heritable PAH patients n=56	Anorexigen associated PAH patients n=35	p
Age at diagnostic, yrs (mean±SD)	41.9 ± 12.8	38.8 ± 12.7	46.9 ± 11.6	<0.005
Gender, female/male (ratio)	72/19 (3.8)	39/17 (2.3)	33/2 (16.5)	<0.01
BMI, Kg/m²	26 ± 5	24 ± 4	28 ± 6	0.0001
NYHA Functional Class				
II	15 (16%)	10 (18%)	5 (14%)	NS
III	62 (68%)	39 (70%)	23 (66%)	
IV	14 (15%)	7 (12%)	7 (20%)	
6MWD, m	303 ± 158	338 ± 150	256 ± 152	<0.05
mPAP, mmHg	62 ± 12	60 ± 13	63 ± 11	NS
PCWP, mmHg	9 ± 3	9 ± 3	10 ± 3	NS
CO, L/min	3.85 ± 1.24	2.30 ± 0.63	2.20 ± 0.67	NS
CI, L/min/m²	2.26 ± 0.64	3.93 ± 1.22	3.75 ± 1.30	NS
PVR, mmHg/L/min	14.5 ± 5.9	14.1 ± 5.9	15.2 ± 6.0	NS
Acute vasodilator response to NO, n (%)	13 (14%)	11 (20%)	2 (6%)	NS
BMPR2 mutation carriers, n (%)	17/39 (44%)	16/34 (47%)	1/5 (20%)	NS
Anorexigen exposure, n (%)	35 (38%)	0	35 (100%)	-
- Fenfluramine and dexfenfluramine, n	32	0	32	
- Benfluorex, n	0	0	0	
- Amphetamines, n	9	0	9	
- Cocaine + heroin, n	1	0	1	
- Unknown, n	1	0	1	
Duration of exposure, month	10 ± 21	NA	10 ± 21	
5-HT_{2B} receptor SNP, n (%)	22/91 (24%)	1/56 (2%)	21/35 (60%)	<0.001
- Homo R6G, n (%)	6 (27%)	1	5 (24%)	
- Homo R6G + E42G, n (%)	12 (55%)	0	12 (57%)	
- Hetero R6G + E42G, n (%)	4 (18%)	0	4 (19%)	

BMI: Body mass index, BMPR2: bone morphogenetic protein receptor type 2 PAH: pulmonary arterial hypertension, NYHA: New York Heart Association, mPAP: mean pulmonary artery pressure, PCWP: pulmonary capillary wedge pressure, CI: cardiac index, CO: cardiac output, PVR: pulmonary vascular resistance NO: nitric oxide, 6MWD: 6-minute walk distance.

Table 2: Demographic and hemodynamic characteristics of patients with 5-HT_{2B} receptor SNP.

	Homo R6G n=6	Homo R6G + E42G n=12	Hetero R6G + E42G n=4	p
Age at diagnostic, yrs (mean±SD)	51.0 ± 13.3	48.0 ± 10.9	42.1 ± 4.5	NS
Gender, female/male	5/1	12/0	3/1	NS
BMI, Kg/m²	28 ± 6	28 ± 6	25 ± 4	NS
NYHA Functional Class, n (%)				
II	1 (17%)	2 (17%)	1 (25%)	NS
III	3 (50%)	8 (66%)	2 (50%)	
IV	2 (33%)	2 (17%)	1 (25%)	
6MWD, m	174 ± 143	280 ± 124	295 ± 201	NS
mPAP, mmHg	66 ± 7	63 ± 10	60 ± 9	NS
PCWP, mmHg	12 ± 3	9 ± 3	7 ± 6	NS
CO, L/min	4.03 ± 1.37	3.34 ± 0.81	4.60 ± 1.74	NS
CI, L/min/m²	2.19 ± 0.64	2.02 ± 0.43	2.61 ± 1.12	NS
PVR, mmHg/L/min	13.7 ± 6.0	16.5 ± 6.1	13.7 ± 6.0	NS
Acute vasodilator response to NO, n (%)	0	0	0	NS
BMPR2 mutation carriers, n (%)	0/0	0/1	0/1	NS
Anorexigen exposure, n (%)	5 (83%)	12 (100%)	4 (100%)	NS
- Fenfluramine and dexfenfluramine, n	5	11	2	-
- Benfluorex, n	0	0	0	
- Amphetamines, n	1	4	2	
- Cocaine + heroine, n	0	0	0	
- unknown, n	0	0	1	
Duration of exposure, month	6 ± 4	7 ± 10	11 ± 12	NS

BMI: Body mass index, BMPR2: bone morphogenetic protein receptor type 2 PAH: pulmonary arterial hypertension, NYHA: New York Heart Association, mPAP: mean pulmonary artery pressure, PCWP: pulmonary capillary wedge pressure, CI: cardiac index, CO: cardiac output, PVR: pulmonary vascular resistance NO: nitric oxide, 6MWD: 6-minute walk distance.

Figure 1

a.

	WT	Hetero SNP	Hetero R6G	Homo SNP	Homo E42G	Homo R6G
Control (100)	94 (94%)	2 (2%)	2 (2%)		2 (2%)	
	WT	Hetero SNP	Hetero R6G	Homo SNP	Homo E42G	Homo R6G
PAH (91)	69 (75,8%)	4 (4,4%)		12 (13,2%)		6 (6,6%)
dex (32)	14 (43,7%)	2 (6,3%)		11 (34,4%)		5 (15,6%)
Amph (9)	2 (22%)	2 (22%)		4 (44,5%)		1 (11,5%)
Cocaine + Heroine (1)	1 (100%)					
Unknown (1)		1 (100%)				
No substance (56)	55 (98,2%)					1 (1,8%)

b.

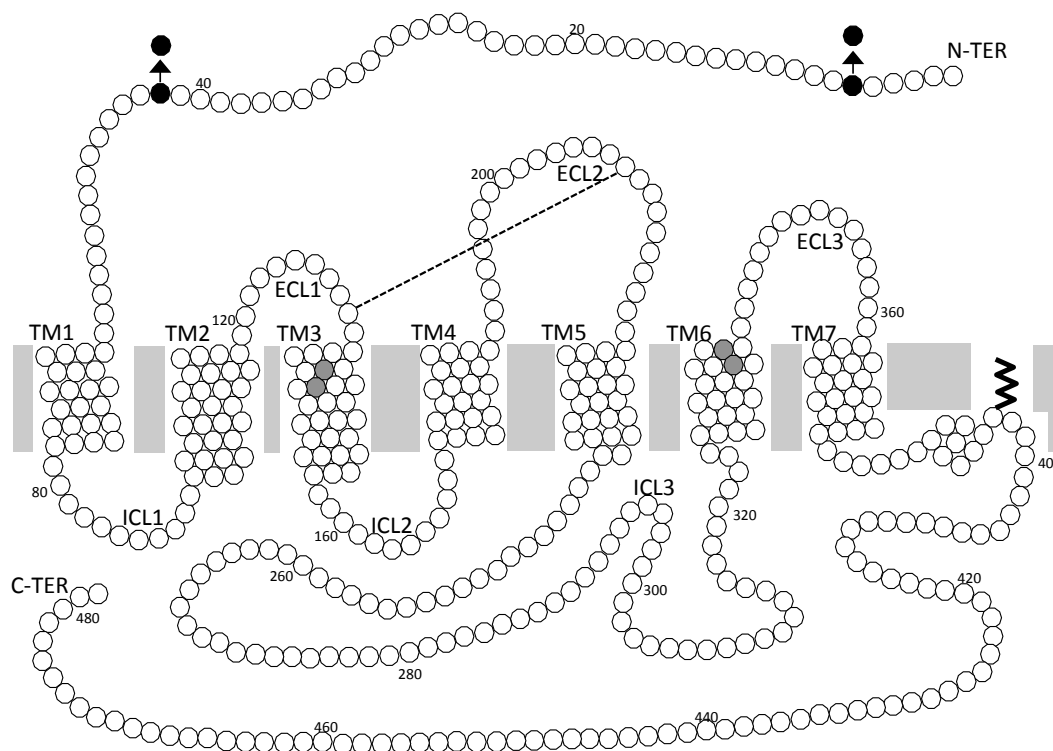


Figure 2

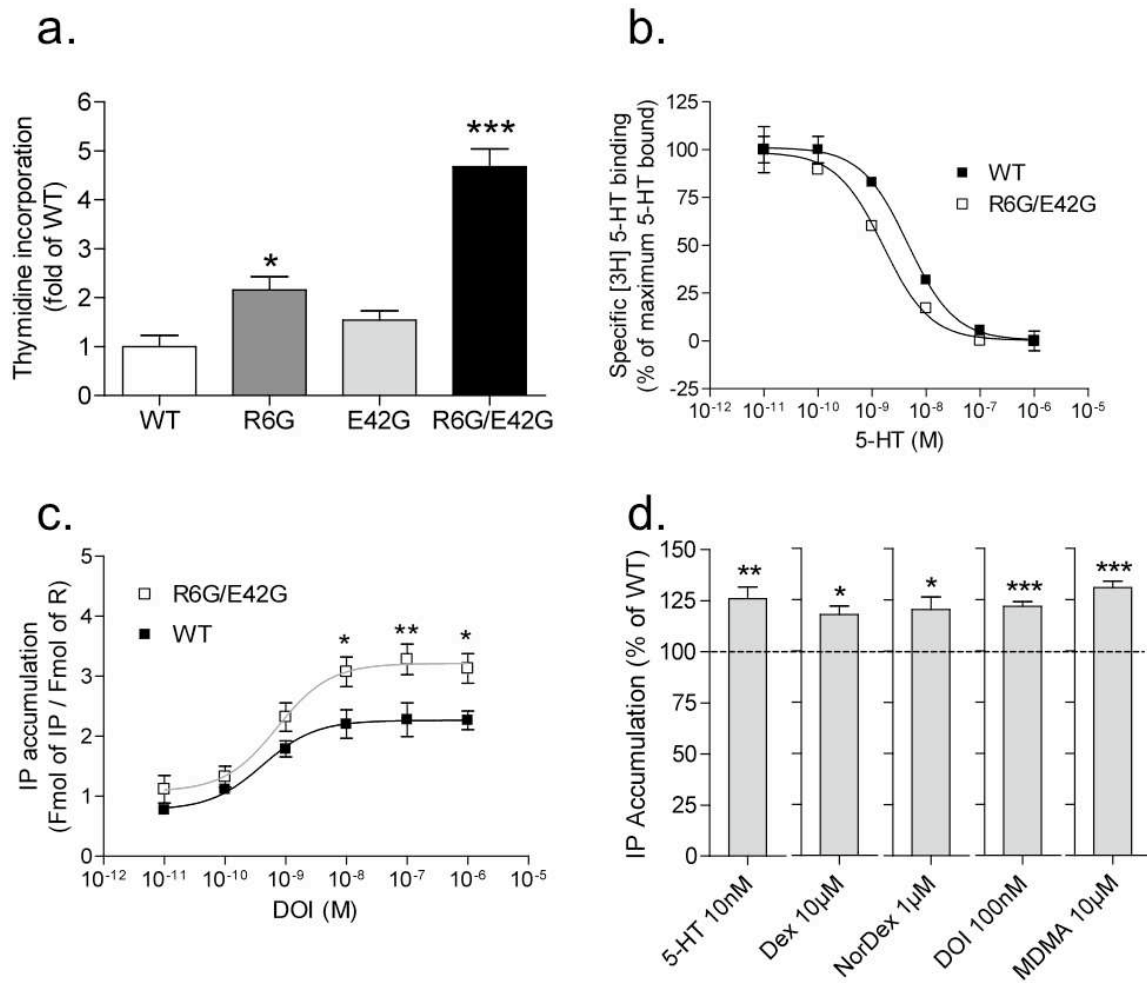
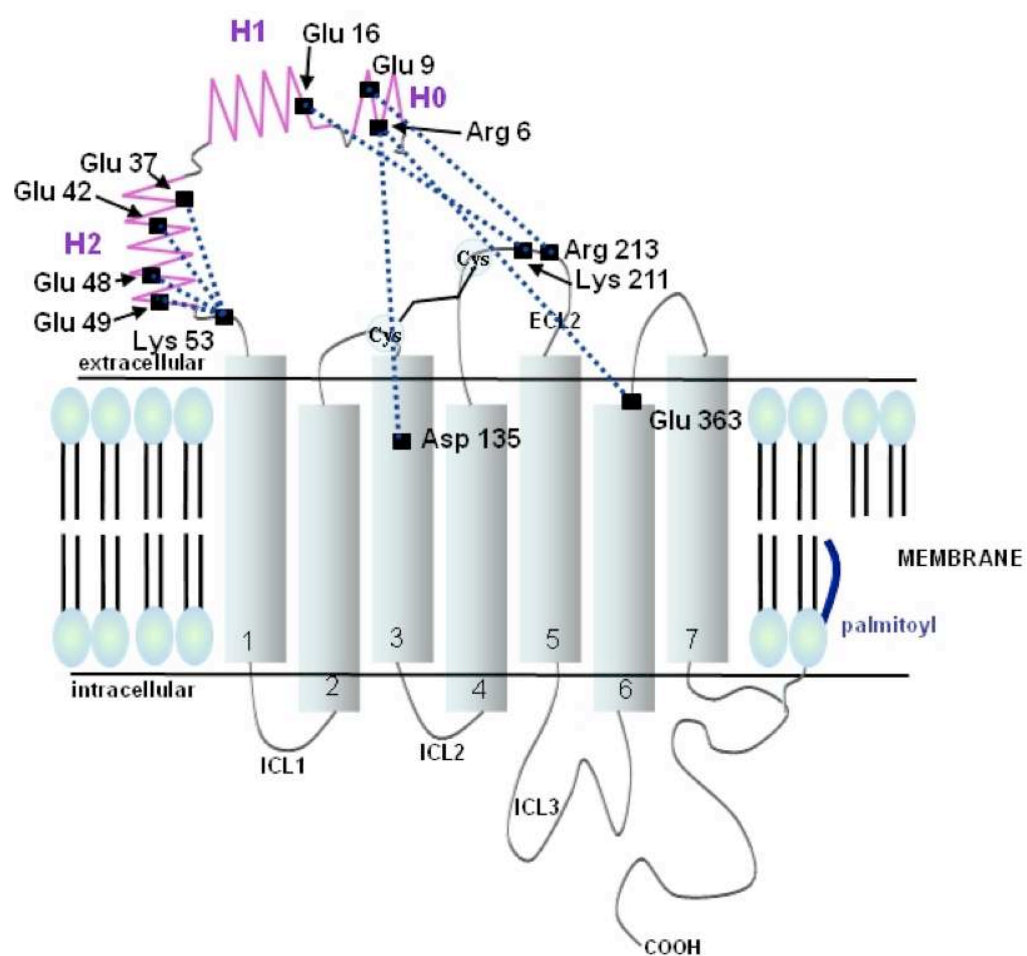


Figure 3

a.



b.

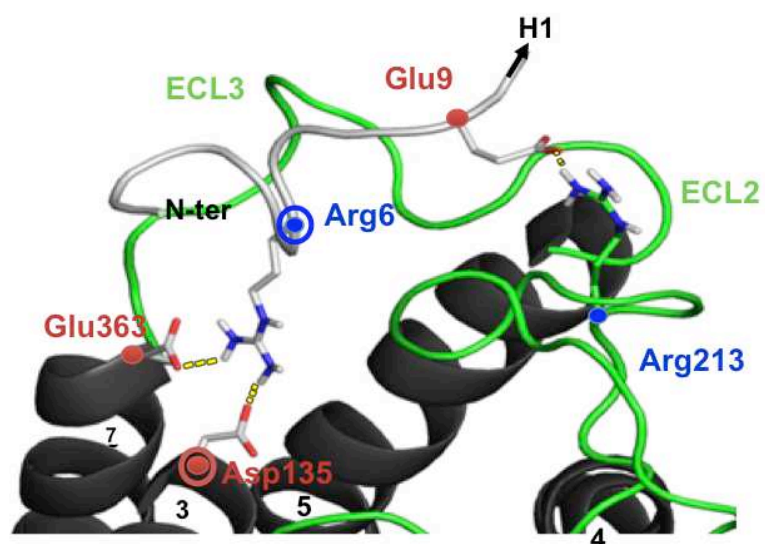


Figure 4

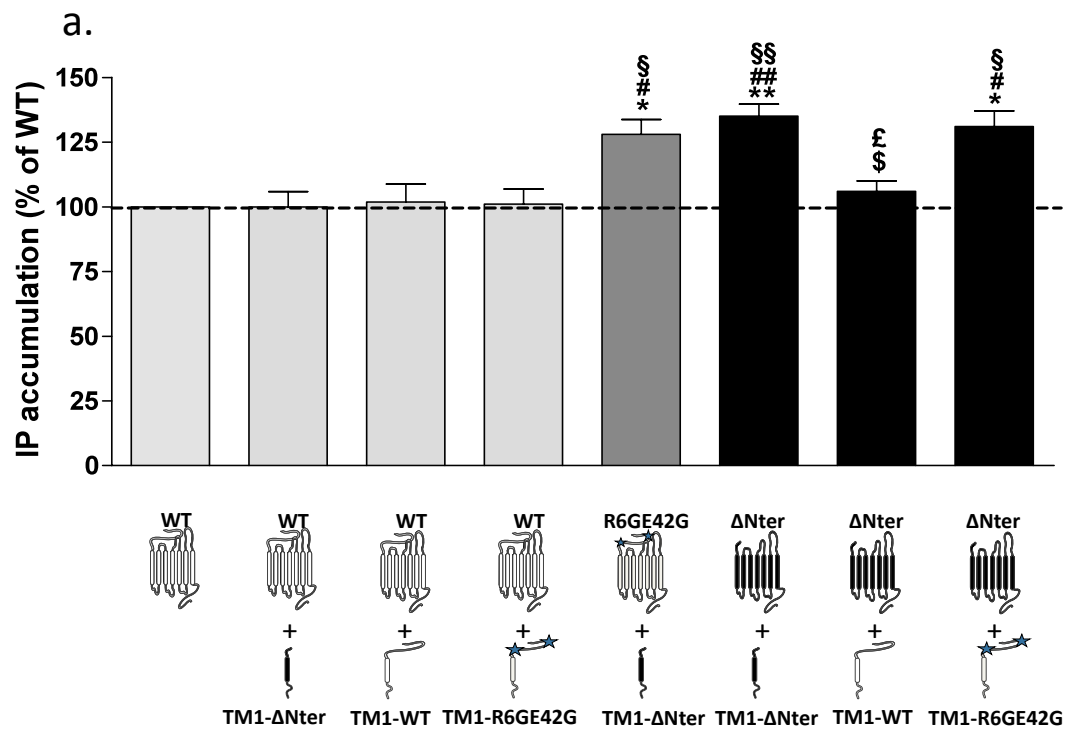


Table S1

			pKi (mean \pm SEM)		Statistical analysis
			5-HT _{2B} WT	5-HT _{2B} R6G/E42G	Two tailed t-test
Agonists	vs. [3H] 5-HT	5-HT	8,41 \pm 0,11	9,05 \pm 0,18	P = 0,0162 (*)
	vs. [125I] DOI	mCPP	7.80 \pm 0.05	7.87 \pm 0.07	NS
		MK212	7.00 \pm 0.08	6.89 \pm 0.10	
		Ro 60.0332	7.78 \pm 0.06	7.93 \pm 0.06	
		DOI	7.64 \pm 0.04	8.03 \pm 0.05	P = 0,0003 (***)
		BW 723C86	7.82 \pm 0.03	8.46 \pm 0.07	P < 0.0001 (***)
		Ro 60.0175	9.30 \pm 0.08	9.23 \pm 0.11	NS
		norDF	8.67 \pm 0.09	8.95 \pm 0.04	
		5-HT	8.25 \pm 0.05	8.87 \pm 0.07	P < 0.0001 (***)
Antagonists	vs. [125I] DOI	Lisuride	8.95 \pm 0.06	8.92 \pm 0.06	NS
		Ro 60.0869	7.97 \pm 0.12	8.05 \pm 0.05	
		RS 10.2221	6.70 \pm 0.04	6.58 \pm 0.10	
		SB 24.2084	7.36 \pm 0.06	7.41 \pm 0.14	
		Ketanserin	6.57 \pm 0.03	6.34 \pm 0.13	
		Mesulergine	8.66 \pm 0.06	8.69 \pm 0.08	
		SB 20.6553	8.13 \pm 0.09	8.42 \pm 0.13	
		Mianserin	8.15 \pm 0.04	8.31 \pm 0.12	
		Ritanserin	8.81 \pm 0.05	9.03 \pm 0.10	
		SB 21.5505	8.89 \pm 0.06	8.92 \pm 0.06	
		SB 20.4741	7.17 \pm 0.05	7.33 \pm 0.11	
		LY 26.6097	9.51 \pm 0.05	9.63 \pm 0.09	
		RS 127.445	9.44 \pm 0.04	9.28 \pm 0.05	
		MDL 100.907	5.96 \pm 0.05	5.87 \pm 0.06	
	vs. [3H] Mesulergine	Mesulergine	8,51 \pm 0,08	8,44 \pm 0,05	
		RS 127.445	9,07 \pm 0,13	8,93 \pm 0,15	

Figure S1

a.

1	54
.....CCCHHHHCCC	CCCHHHHHHH HHCCCHHH.C CCHHHH.... HHCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCC
2B Nterm....MALSYRVSEL	QSTIPEHILQ STFVHVIS.8 NWSGLQ....TESIPEEMKQIVEEQGNKLHWAA
P160.....EG	QS..DERALL DQLHTLLSNT DATGLEEDIR ALGIPELVNQGQALEPK
.....CC	CC..HHHHHH HHHHHHHHCCC CCHHHHHHHH HCCHHHHHHHHCHHHCCC

b.

Nt H0 H1 H2 H3 TM1

1 MALSYRVSELQSTIPEHILQSTFVHVVISSNW SGLQTESIPEEMKQIVEEQGNKL 54

Figure S2

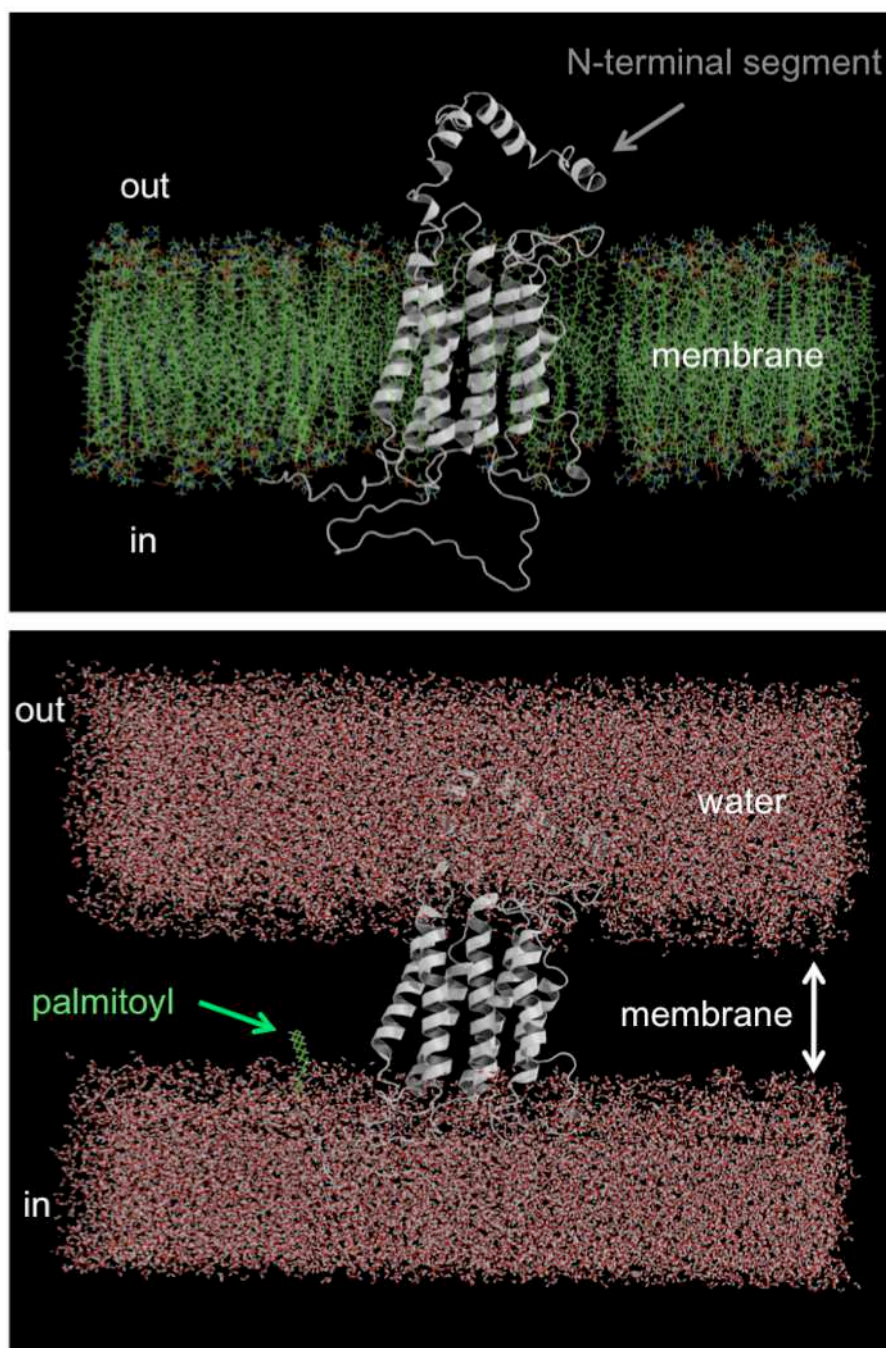
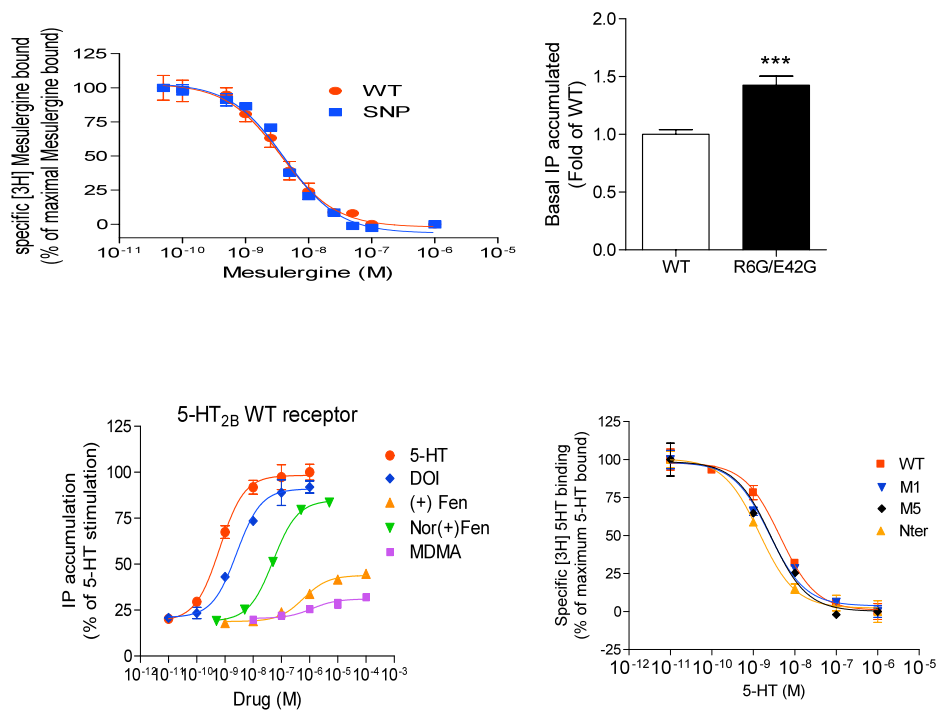


Figure S3



e.

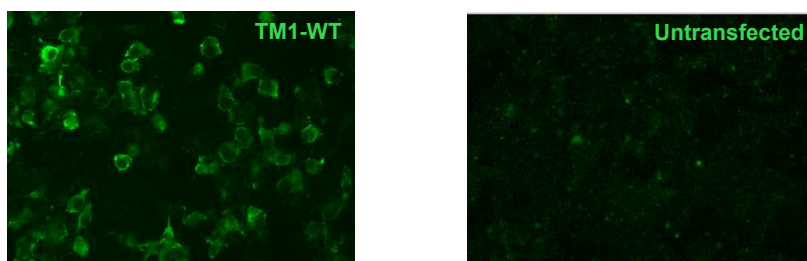
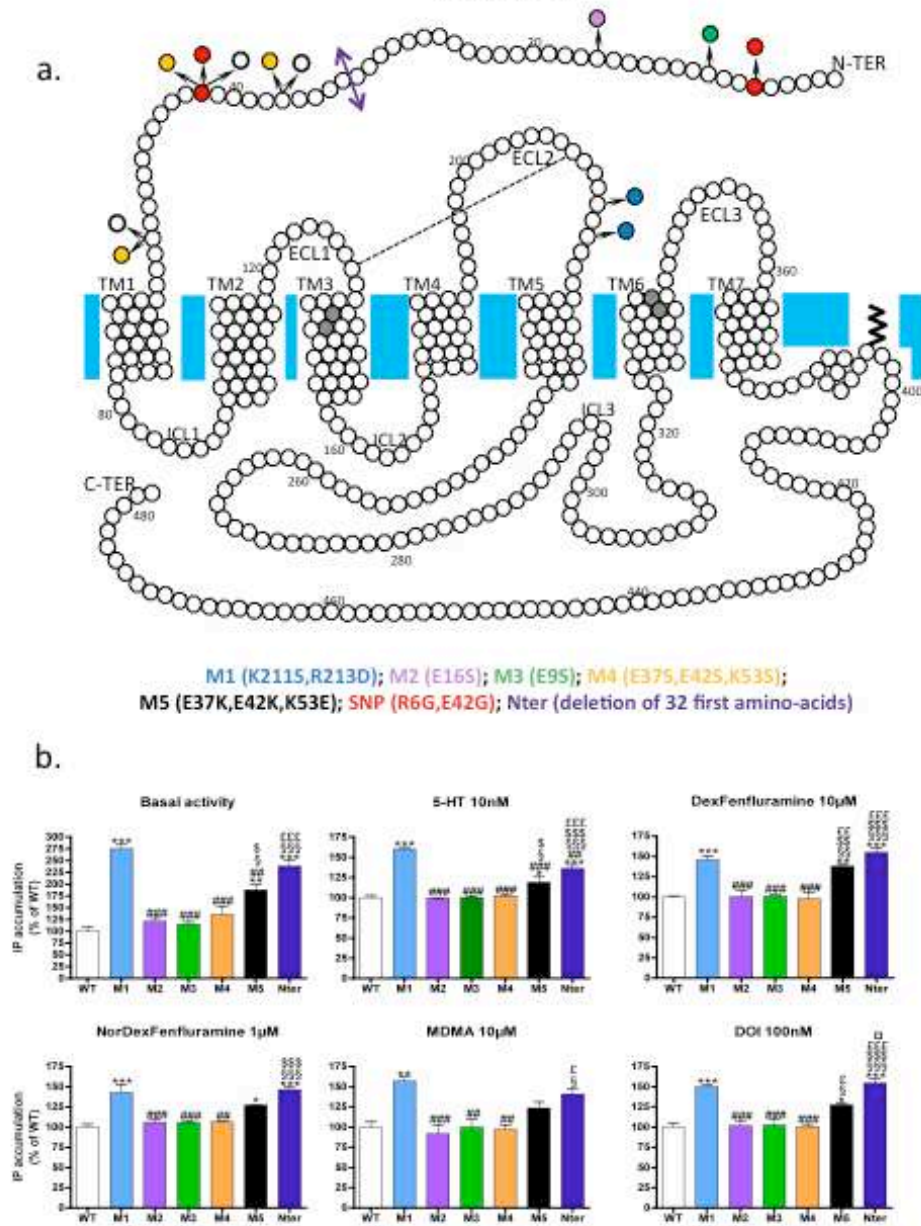


Figure S4



4.4.1. Résultats

Les résultats obtenus pour l'article 2 sont décrits ci-dessous:

(i) Mise en évidence par séquençage des 3 exons du récepteur 5-HT_{2B}R du variant (SNP) R6G/E42G situé dans la partie N-terminale dans une cohorte de 91 patients atteints d'HTAP. Une proportion significative de patients HTAP sont porteurs du SNP par rapport à la population témoin (WT) : 13,2 % à l'état homozygote et 4,4 % à l'état hétérozygote contre 0 et 1% respectivement. Dans la population de patients ayant pris des anorexigènes dérivés de la fenfluramine, 60 % présentent le polymorphisme sous différentes formes : 34,3 % sont homozygotes R6G/E42G, 14,3 % sont homozygotes R6G et 11,4 % sont hétérozygotes R6G/E42G. Les résultats obtenus permettent d'établir une corrélation entre la présence de SNP du 5-HT_{2B}R dans la population de malades et l'utilisation d'anorexigènes dérivés de la fenfluramine.

(ii) Le SNP agit comme un gain de fonction avec augmentation de la prolifération du SNP par rapport au WT mesurée par incorporation de thymidine. L'augmentation de la prolifération après traitement par la 5-HT est mise en évidence pour les polymorphismes les plus fréquents : 2 fois pour le R6G et 5 fois pour le R6G/E42G par rapport au WT. L'augmentation de la prolifération s'accompagne d'une augmentation d'affinité restreinte aux agonistes : 5 fois plus d'affinité vis à vis de la 5-HT pour le variant que pour le récepteur sauvage.

(iii) Proposition d'un mécanisme d'interaction entre la partie N-terminale (N-ter) et le site actif du récepteur sur la base des variants moléculaires obtenus par séquençage. L'étude de modélisation moléculaire réalisée à partir du modèle 3D du 5-HT_{2B}R (Nter inclus) met en évidence une interaction de l'Arg6 avec deux résidus du site actif (Asp135, Glu363). La partie N-terminale se replie ainsi sous forme d'un couple d'hélices par l'intermédiaire d'autres résidus induisant des interactions électrostatiques : Glu42-Lys53, Glu9-Arg213 (boucle extracellulaire, ECL2), Glu16-Lys211.

(iv) Augmentation du couplage G_q pour le SNP. L'augmentation de l'activation du récepteur R6G/E42G est obtenue au niveau basal (+40% du taux d'IP₃ du WT) et après activation par différents agonistes (entre +17 et +40 % par rapport au WT).

(iv) Validation des interactions partie N-terminale/DTM du récepteur par mutagenèse dirigée. Les mutants M1 (K211S/R213D), M5 (G37K, E42K, K53E) et le mutant ΔNter (délétion des aa 1 à 32) montrent une affinité augmentée pour la 5-HT comparée au WT : 2 fois pour M1 ou M5 et 5 fois pour ΔNter. Les résultats de couplage obtenus

montrent une nette tendance à l'augmentation (+150 % pour M1 et Δ Nter ; 135 % pour M5). Ces résultats sont confirmés pour la fenfluramine et la nordexfenfluramine.

(v) Confirmation du mécanisme de la partie N-terminale sur cultures cellulaires. La « compensation » moléculaire est testée sur des cellules transfectées exprimant des récepteurs (WT, R6G/E42G et Δ Nter) et une partie supplémentaire composée du DTM1 portant une extrémité N-terminale variable (DTM1-WT, DTM1-R6G/E42G et DTM1- Δ Nter). Alors que la partie DTM1-WT permet d'obtenir des niveaux de couplage G_q proche de ceux du WT en présence du récepteur Δ Nter, l'absence de DTM1 fonctionnel (DTM1-R6G/E42G et DTM1- Δ Nter) augmente le couplage. Pour la construction chimérique Δ Nter et DTM1-R6G/E42G, l'activation du récepteur augmente de plus de 125% par rapport au taux d'IP₃ WT (100%). De la même façon, le DTM1- Δ Nter ne permet pas de restaurer les taux du WT avec un taux d'IP₃ de 125%.

Ces résultats démontrent un rôle de gain de fonction prolifératif du SNP. Le rôle de la partie N-terminale dans le contrôle de l'activité intrinsèque et lors de l'activation est également suggéré.

4.5. Discussion et perspectives

4.5.1. Rôle de la partie N-terminale du récepteur 5-HT_{2B}

Comme pour le travail de modélisation réalisé pour l'étude de l'ATP7B (ou celui des récepteurs 5-HT_{2B} humains et murins), le but de ce travail de modélisation moléculaire sur le 5-HT_{2B}R était de proposer un mécanisme permettant de comprendre l'impact du SNP de la partie N-terminale (R6G/E42G) en terme physiopathologiques. Ainsi, nous avons proposé un repliement de la partie N-terminale (N-ter) sous forme de deux hélices (voir la partie Methods de l'article 2). Ce repliement permet à des résidus chargés du Nter (Arg6, Glu42) d'interagir avec des résidus de la boucle extracellulaire 2. Il permet, via une majorité d'interactions électrostatiques, à la partie N-terminale de venir interagir avec Asp135 et Glu363, résidus impliqués dans la liaison à la 5-HT (Manivet *et al.*, 2002). A notre connaissance, c'est la première fois qu'est proposée l'interaction du Nter au sein des DTM d'un RCPG de classe A (ou *rhodopsin-like*) avec validation pharmacologique par mutagenèse dirigée et construction chimérique de parties N-terminales variables.

Bien que le nombre de structures 3D pour les DTM des RCPG augmente de jour en jour pour la classe A, aucune structure n'est disponible pour la partie N-terminale alors que pour le récepteur au CRF de type 2 (CRF-R2), qui est un RCPG de classe B, le Nter est structuré et porte le site de liaison du ligand (Grace *et al.*, 2007). Cette absence de structure de la partie N-terminale des RCPG de classe A peut s'expliquer pour différentes raisons. La raison la plus fréquemment invoquée est l'absence de densité électronique suffisante, notamment dans les dernières études structurales réalisées par cristallographie aux rayons X pour le récepteur à la dopamine D₃R (Chien *et al.*, 2010) et pour le récepteur à la chimiokine CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). Ainsi, sous prétexte d'une grande flexibilité, il est admis que les parties N-terminales de cette classe de RCPG sont « désordonnées » (sans structures secondaires fixes). Une des explications avancées est leur trop faible longueur qui empêcherait un repliement stable (pour revue voir Millan *et al.*, 2008). Bien qu'ils aient une partie N-terminale plus courte (<100 résidus) que les deux autres classes de RCPG, les longueurs des RCPG de classe A sont loin d'être négligeables. Une recherche sur la base de données protéiques Uniprot permet d'obtenir un aperçu de la longueur de la partie N-terminale pour les 5-HT₂R et les RCPG cristallisés (cf. Annexe 2). Pour le 5-HT_{2B}R que nous voulons modéliser, il s'agit de 56 aa, longueur importante comme chez les autres récepteurs 5-HT₂. Nous sommes partis de l'hypothèse que le repliement n'est pas quelque chose de figé comme le suggère de nombreuses études biophysiques. Un pan de la biologie structurale et de la modélisation moléculaire s'intéresse d'ailleurs à ces protéines dites désordonnées qui changent de repliement. Les pathologies humaines associées à ces protéines changeant de conformations sont rassemblées sous le terme de maladies conformationnelles (pour revue voir Luheshi *et al.*, 2009). L'absence de structure 3D disponible pour la partie N-terminale ne signifie pas forcément que cette partie ne soit jamais « foldée ». La nature des phospholipides par exemple est capable d'influencer le repliement d'un peptide ou d'une protéine (cf. l'exemple de la protéine prion exprimée dans un système membranaire de radeaux lipidiques Elfrink *et al.*, 2008). Compte tenu des résultats obtenus pour la protéine prion, il serait intéressant de rechercher la présence du 5-HT_{2B}R dans ces microdomaines à la composition biochimique et aux propriétés fonctionnelles particulières. En effet, la présence du SERT dans ces radeaux a été confirmé *in vivo* (Magnani *et al.*, 2004). Peu d'études en modélisation (et en biologie structurale) se sont intéressées au rôle de la

partie N-terminale des récepteurs «aminergiques» (MacRobb *et al.*, 2010) ou des RCPG de classe A en général.

Avant d'analyser plus en détail les implications et les perspectives pharmacologiques quant au rôle du SNP (R6G/E42G) dans la fonction propre de la partie N-terminale, une comparaison s'impose avec les autres mutations déjà connues du 5-HT_{2B}R. En pathologie humaine, seule une mutation a été rapportée. Nous avons déjà évoqué le cas de cette patiente décédée d'une HTAP après la prise de fenfluramine qui est un dérivé amphétaminique utilisé pour ses propriétés anorexigènes (Blanpain *et al.*, 2003). La mutation R393X retrouvée chez la patiente aboutit à un codon stop dans la partie C-terminale qui vient tronquer le site de palmitoylation (nécessaire à l'arrimage de la partie C-terminale du récepteur à la membrane) et la partie portant le domaine PDZ (nécessaire au couplage aux NOS constitutives). Au niveau pharmacologique, l'affinité de la 5-HT pour le mutant n'est pas modifiée mais l'EC₅₀ pour la voie G_q augmente de façon si importante qu'une perte du couplage totale a été envisagée. Le nombre de récepteurs exprimés (mesuré par le B_{max}) n'est pas différent pour le récepteur sauvage et le mutant (Blanpain *et al.*, 2003). Une étude pharmacologique approfondie montre que la perte de couplage G_q et NOS s'accompagne d'une augmentation du couplage à la voie des MAPK par l'intermédiaire de G_{α13} (Deraet *et al.*, 2005). *In vitro*, la présence du mutant R393X n'a pas d'effet sur la pharmacologie du récepteur sauvage (absence d'effet dominant négatif). Il s'ensuit un gain de fonction prolifératif pour le mutant R393X avec augmentation d'efficacité pour plusieurs agonistes. Par exemple, la nordexfenfluramine devient un agoniste total pour le couplage MAPK. Par contre, la prolifération mesurée sans ligand (activité constitutive) n'est pas significativement différente du WT alors qu'en présence de 5-HT (1 μM) elle atteint 8 fois le taux du WT. A titre de comparaison, la mesure de la prolifération pour le SNP (R6G/E42G) montre une augmentation d'incorporation de thymidine 5 fois supérieure au WT pour une dose de 5-HT identique. Les différences observées entre les deux mutants concerne principalement l'affinité des agonistes. En effet, la prolifération augmente de manière substantielle dans les deux cas. Cette différence pourrait s'expliquer par une perturbation de la conformation active dans le cas du SNP. Des études complémentaires doivent être envisagées dans le cas du SNP pour savoir si la diminution de l'internalisation observée pour le R393X est présente.

En bref, au niveau pharmacologique, le SNP provoque une augmentation de l'activité basale et après activation du récepteur pour le couplage G_q et pour la prolifération. La présence du SNP entraîne un gain de fonction en terme d'activité constitutive avec une sensibilité augmentée pour les agonistes (Figure 2, S3 et S4, Article2). Ce gain de fonction pour le SNP perturbe l'action agoniste inverse du Nter qui n'est plus capable d'empêcher l'activation du récepteur en présence ou en absence d'agoniste. Ces résultats doivent être comparés à ceux obtenus pour le récepteur tronquée des 32 premiers aa (Δ Nter). Il est ainsi possible d'extrapoler sur la fonction générale du Nter dans le récepteur voire peut être pour les autres GPCR à forte activité constitutive. A l'état basal, le récepteur Δ Nter a une production d' IP_3 2,5 fois plus élevée que le WT (Figure S3, Article2). La construction d'un TM1 chimérique avec un Nter variable nous a permis de démontrer le rôle stabilisateur du Nter (Figure 4, Article 2). Seul un Nter fonctionnel (TM1 ou récepteur complet) est capable de diminuer l'activation des récepteurs mutés (SNP ou Δ Nter). L'augmentation de l'affinité mesurée restreinte aux agonistes peut s'interpréter de différentes façons. La première est l'augmentation de l'accessibilité au site actif du récepteur. Or, pour le SNP, les antagonistes n'ont pas une affinité différente par rapport au WT. La seconde pourrait concerner le rôle du Nter sauvage dans la stabilisation d'une conformation moins affine pour les agonistes.

La notion d'activité constitutive (ou intrinsèque) devient de plus en plus complexe à mesure que les données structurales viennent valider ou non les hypothèses pharmacologiques. Elle est caractérisée par l'augmentation de l'activité du RCPG en absence de ligand et s'accompagne aussi selon les récepteurs d'une augmentation d'efficacité. La présence d'activité constitutive à des niveaux différents selon le récepteur s'expliquerait par la préexistence d'une conformation active du récepteur en absence de ligand. Cette notion s'inscrit dans la théorie du complexe ternaire « étendu » qui considère trois partenaires : ligand, récepteur, protéine G. L'agoniste, qui a une forte affinité pour la conformation active du récepteur, est capable de déplacer l'équilibre préexistant pour augmenter la proportion de récepteurs sous conformation active. Les antagonistes ont la même affinité pour les deux formes du récepteur alors que les agonistes inverses qui bloquent l'activité (constitutive) du récepteur ont plus d'affinité pour la forme inactive. Cette notion a permis de faire évoluer la distinction entre antagonisme et agonisme inverse (pour revue voir Kenakin, 2004).

L'activité constitutive est utile à nombre de fonctions physiologiques et son niveau varie au sein d'une famille de récepteurs. Par exemple le récepteur β_2 -AR a une activité constitutive supérieure à celle du β_1 -AR. Dans la famille dopaminergique, le récepteur D_{1B} est celui qui a l'activité constitutive la plus importante (pour revue Tao, 2008). Ceci semble être le cas pour les récepteurs 5-HT₂ dont les plus connus sont le 5-HT_{2A}R et 5-HT_{2C}R (pour revue voir Teitler *et al.*, 2002). L'activité constitutive du 5-HT_{2B}R a pourtant été montrée à des niveaux différents sur plusieurs lignées cellulaires : sur la lignée sérotoninergique 1C11* pour les couplages G_q (Loric *et al.*, 1995), PLA2 (Tournois *et al.*, 1998) et aux NOS (Manivet *et al.*, 2000) ainsi que sur des lignées cellulaires dérivant d'une tumeur carcinoïde gastrique pour la voie des MAPK (Launay *et al.*, 1996). L'activité basale la plus importante concerne le couplage aux MAPK via Ras (Launay *et al.*, 1996). Les cellules LM5 (fibroblastes transfectées de manière stable par le 5-HT_{2B}R) présentent une prolifération basale importante inhibée par l'utilisation d'un agoniste inverse (rit ansérine). Or, c'est justement ce type de ligand qui est utilisée couramment pour démontrer et quantifier l'activité constitutive d'un récepteur. Ce résultat est à mettre en perspective par rapport aux résultats obtenus de manière basale ou après activation. D'où la nécessité de réaliser un profil pharmacologique complet du SNP et du Δ Nter pour les autres voies de couplage. En effet, les mutations modifiant l'activité constitutive peuvent perturber une ou plusieurs voies effectrices par le biais de protéines G différentes ou par des voies indépendantes des protéines G (ex couplage aux cNOS).

Dans le cas du récepteur à la LH par exemple, la plupart des mutations augmentent l'activité constitutive G_s-dépendante mais plus rarement celle dépendant de G_{i/q} (pour revue Seifert *et al.*, 2002). L'interprétation de l'impact de la mutation sur l'activité du récepteur va dépendre du niveau d'activité constitutive du récepteur sauvage. Dans le cas de notre SNP où les 2 activités constitutives basale et stimulée sont augmentées, on parle de mutant hyper-répondant, à l'opposé des mutants où seule l'activité constitutive va être modifiée (mutants normo-répondants).

La question du rôle du Nter se pose. Les Nter sont-ils responsables des différences d'activité constitutive observée chez les différents 5-HT₂R ? Malgré une longueur semblable, les résidus R6 et E42 mutés dans le cas du SNP ne sont pas présents chez les deux autres récepteurs. Il serait intéressant de tester la substitution de la partie N-terminale du 5-HT_{2B}R par celle du 5-HT_{2A}R ou 5-HT_{2C}R pour voir l'impact sur l'activité

constitutive et le couplage du récepteur par rapport au SNP et à la délétion du Nter (Δ Nter). Ceci permettrait de savoir si les propriétés du Nter sont spécifiques au 5-HT_{2B}R. Nos résultats posent la question de la relation entre Nter et transduction du signal depuis la partie extracellulaire jusqu'aux parties intracellulaire du récepteur responsables du couplage (protéines G, etc...).

Nous proposons un mécanisme d'action original pour le 5-HT_{2B}R mais il reste à savoir quels sont les déterminants structuraux impliqués dans l'activité constitutive des autres RCPG ? Sont-ils différents de ceux en présence d'agoniste ? Les polymorphismes ou mutations qui perturbent l'activité constitutive sont le plus souvent situés dans les DTM, voir dans la partie C-terminale du RCPG. Surtout étudié dans le cadre de l'activation classique, les motifs conservés des RCPG participent également à l'activité constitutive. L'étude de tous les déterminants structuraux va être essentielle dans la suite de ce travail pour relier la fonction du Nter à l'activité constitutive.

Décrit d'abord pour le β_1 -AR, le *ionic lock* est un pont salin qui participe à l'activation de nombreux RCPG à travers l'interaction R3.50(DTM3)-D(E)6.30(DTM6) (selon la numérotation admise, Ballesteros *et al.*, 1995). La rupture de ce pont salin fait partie des mécanismes classiques d'activation décrit pour les RCPG, son rôle dans l'activité constitutive est moins clair.

Par exemple, dans le cas du β_1 -AR, la perte de E.6.30 empêche l'interaction avec R3.50 qui appartient au motif DRY et provoque une augmentation de l'activité constitutive (Ballesteros *et al.*, 2001). Dans le cas du récepteur à l'histamine H₂R, récepteur connu pour avoir une forte activité constitutive, la mutation d'Asp115 (D3.49) du motif DRY entraîne une augmentation de l'activité constitutive et l'instabilité du récepteur en absence de ligand (Alewijjnse *et al.*, 2000). L'instabilité structurale observée n'est pas la norme pour tous les RCPG. Pourtant ce motif qui est très conservé chez les récepteurs aminergiques ne semble pas être le seul déterminant contrôlant l'activité constitutive. La reconstruction par mutagénèse de ce pont salin (A6.30E) dans le H₄-R ne modifie pas la très forte activité constitutive du récepteur (Schneider *et al.*, 2010). Un autre pont salin a été suggéré pour expliquer ce résultat ainsi que le rôle de Y3.60 appartenant au motif NPXXY du DTM7. Ce motif a déjà été évoqué dans l'étude de modélisation moléculaire du 5-HT_{2B}R où N376 (N3.44) interagit avec D100 (D2.50) et avec Y380 (Y7.53). Cette interaction est essentielle dans l'activation du récepteur. Dans le cas du récepteur à la TSH (TSH-R), la perturbation de l'interaction N3.44-D2.50 par différentes

mutations entraîne une augmentation plus ou moins importante de l'activité constitutive (Urizar *et al.*, 2005).

La mutation de Y3.80 dans le récepteur 5-HT_{2C} va produire des mutants à l'activité constitutive variable selon la substitution réalisée (Prioleau *et al.*, 2002). Pour autant, la majeure partie des mutants ont une activité constitutive supérieure au 5-HT_{2C}R sauvage, certains devenant même totalement insensibles à la 5-HT. Dans notre cas, il serait donc intéressant d'étudier par modélisation moléculaire les conséquences d'une ablation de la partie Nter et celui de différents motifs structuraux (DRY, NPXXY).

Le maintien de ces différentes interactions semble nécessaire afin de garder le récepteur à l'état inactif. Quelles vont être les différences pouvant expliquer la stabilisation de la conformation du récepteur à l'état « inactif » et la conformation pour laquelle l'agoniste aura le plus d'affinité ? L'étude de l'interaction RPCG/protéines G est un axe prometteur. La présence des protéines G influence la stabilisation du récepteur en absence de ligand. Ces protéines participent à l'activité constitutive comme cela a été montré pour le β_2 -AR. La déplétion en nucléotides (GTP ou GDP) de la protéine G_s bloque le récepteur dans une conformation « active » sans ligand, conformation responsable de l'activité constitutive (Yao *et al.*, 2009). L'utilisation d'un agoniste inverse empêche la formation du complexe récepteur-protéine G sans influencer les complexes déjà formés, confirmant le rôle de la protéine G dans l'activation en absence de ligand. Le rôle du DTM6 ainsi que des motifs conservés comme le DRY (DTM3) ou le NPXXY (DTM7) dans l'activation ont été confirmés récemment par des études structurales de l'opsine (rhodopsine en absence de ligand) en présence d'un peptide de la protéine G_α (transducine) (Scheerer *et al.*, 2008) ou celle du β_2 -AR en présence d'un fragment d'anticorps mimant la présence d'une protéine G (Rasmussen *et al.*, 2011).

Une étude de modélisation approfondie du β_2 -AR a permis la mise en évidence de profils énergétiques différents pour les conformations en présence d'agoniste, d'agoniste partiel ou d'agoniste inverse (Bhattacharya *et al.*, 2010). Ils confortent les résultats expérimentaux par BRET qui montrent des cinétiques d'activation différentes pour ces différents ligands (Galés *et al.*, 2006). Bhattacharya et Vaidehi suggèrent que la « barrière d'activation », différente selon le type de ligand utilisé, pourrait expliquer les différences observées (rotation des DTM5-6, polarisation par les molécules d'eau..). Plus généralement, la question reste posée concernant le rôle du Nter dans l'activité constitutive. On pourrait l'envisager comme un moyen général permettant de contrôler

cette activité de manière fine. La mesure de l'activité constitutive, possible aujourd'hui même à des niveaux faibles, suggère que tout récepteur posséderait une activité constitutive mais à un niveau différent selon le récepteur.

Il reste à expliquer pourquoi certains récepteur présentent une activité plus élevée que d'autres. Le maintien de nombreux RCPG « silencieux » en absence d'agoniste semble être la règle et est un phénomène conservé au cours de l'évolution. Par contre, comment faire alors dans le cas où certains récepteurs doivent être actifs même en absence de stimulation externe ? Le Nter serait donc un moyen de contrôle, notamment dans le cadre de fonctions embryologiques. L'exemple du récepteur 5-HT_{2B}R plaide en ce sens. Quelle peut être dans ce contexte l'impact d'un SNP ou d'une mutation située dans la partie N-terminale ? L'exemple du récepteur à la mélanocortine MC₄-R permet de faire le lien entre Nter et activité constitutive. De nombreuses mutations du MC₄-R sont associés à l'obésité dont certaines localisées sur la partie N-terminale relativement courte (40 aa) du récepteur. Elles entraînent une diminution de l'activité constitutive mesurée *in vitro* (Srinivasan *et al.*, 2004). Les différentes mutations du Nter testées qui sont retrouvés en clinique aboutissent à une diminution d'activité constitutive d'au moins 50% (R18H, R18L, R18C, T11S). Les auteurs ont voulu comprendre par quel mécanisme le Nter pouvait médier l'activité constitutive élevée du MC₄-R. Ils ont d'abord réalisé un mutant avec une extrémité Nter raccourcie des 24 premiers aa associées à des constructions chimériques avec des Nter de séquences différentes (WT, R18C). Comme pour le cas de notre SNP, leurs résultats montrent que seul un Nter sauvage est capable de restaurer l'activité constitutive du récepteur Nter tronqué. Ils ont également fait le lien entre Nter et site de liaison de l'agoniste naturel. Ils démontrent que la mutation d'un des résidus chargés (D126) connus pour interagir avec ce ligand renforce l'effet de la mutation R18C. Sans proposer d'explication structurale, les résultats de cette étude plaident, comme dans le cas du SNP du 5-HT_{2B}R, pour une liaison directe du Nter au sein du récepteur. Il serait intéressant de tester l'impact des mutations D135A et E363A sur l'activité constitutive du récepteur 5-HT_{2B}. Malgré cela, des différences existent entre les deux études. Dans notre cas, les simples mutants M2 (E9S) et M3 (E16S) du Nter affectent peu l'activité constitutive (Supplémenter Fig. S4, Article 2). Dans le cas du MC₄-R, la liaison de l'agoniste n'est pas modifiée pour les différents mutants de R18. De plus, aucune mutation située sur la boucle 2 extracellulaire du MC₄-R (ECL2) n'a été décrite comme modifiant l'activité constitutive. Dans notre cas, le mutant M1 (K211S, R213D)

qui nous permet de valider les interactions N-ter-ECL2 a une activité constitutive fortement augmentée (> 250 %).

Le rôle des ECL, dont ECL2, dans les processus d'activation ou dans l'activité constitutive a déjà été évoqué. Une mutation créant un pont disulfure artificiel entre la partie N-terminale et la boucle extracellulaire 3 stabilise la rhodopsine et permet au Nter de se replier sous forme de deux feuillets β (Stardust *et al.*, 2007).

La rupture d'un pont disulfure reliant la partie N-terminale et l'ECL2 du GPR39 aboutit à l'augmentation de l'activité constitutive (Storjohann *et al.*, 2008). Dans ce cas est également observé une diminution d'expression membranaire de certains mutants qui vient compliquer l'interprétation, la glycosylation des mutants étant abolie.

Dans le cas des récepteurs adrénergiques, un SNP a été retrouvé dans le Nter du récepteur β_1 -AR (S49G). Il est associé à une durée de vie plus longue chez les patients insuffisants cardiaques porteurs de ce polymorphisme (Levin *et al.*, 2002). Le S49G a une activité constitutive augmentée associée à une très légère augmentation d'affinité pour les agonistes. De plus, il présente une désensibilisation plus importante, ce qui semble être cardioprotecteur. Un lien est ainsi fait entre activité constitutive et désensibilisation. Aucune hypothèse structurale ne permet d'expliquer l'impact de ce polymorphisme sur le Nter du β_1 -AR. Dans le cas du 5-HT_{2B}R, la présence du SNP restreinte majoritairement aux malades HTAP consommateur d'anorexigène ne plaide pas en faveur d'un rôle bénéfique. Cet aspect va dépendre des résultats obtenus pour le SNP concernant la désensibilisation. Quelles conséquences sur le rôle du Nter dans l'internalisation pour le 5-HT_{2B}R si l'on considère que cette partie peut jouer le rôle d'agoniste inverse alors que les agonistes inverses sont connus pour favoriser la désensibilisation (pour revue voir Milligan *et al.*, 1997).

La question de la désensibilisation est centrale tant sur le plan de la compréhension fondamentale des mécanismes de régulation d'expression membranaire que pour d'éventuelles perspectives thérapeutiques impliquant le développement d'agonistes inverses dans l'HTAP. En effet, sur cellules transfectées, le mécanisme d'internalisation mesuré par la demi-vie membranaire est influencée par la concentration en agoniste (5-HT), la présence d'un autre récepteur (5-HT_{1B}R) mais participe aussi à la réponse biologique du 5-HT_{2B}R (Anasazi *et al.*, 2007). Deux voies d'internalisation ont été décrites : la voie cavéoline-dépendante qui aboutit à la production de NO, la voie clathrine-dépendante aboutissant à l'activation de la voie des MAPK.

Les résultats que nous avons obtenu plaident pour un rôle différent de celui classiquement attribué au Nter dans l'adressage membranaire. Une étude récente réalisée sur le récepteur dopaminergique D₂ montre que la délétion (progressive ou sélective) de la partie N-terminale diminue l'expression membranaire, augmente l'internalisation et dans une moindre mesure perturbe le couplage en diminuant la quantité d'AMP_c produite (Cho *et al.*, 2011). Les sites de délétion choisis tiennent compte notamment des sites de glycosylation, connus pour jouer un rôle dans l'adressage membranaire. On peut regretter que cette étude se focalise surtout sur la question de l'internalisation et de l'expression membranaire. Le « profil pharmacologique » réalisé montre que l'affinité pour les agonistes et les antagonistes n'est pas modifiée comme la désensibilisation obtenue après des préstimulations avec un agoniste. Par contre l'EC₅₀ augmente de manière proportionnelle avec la longueur de la délétion réalisée. Le rajout d'une séquence non spécifique en partie N-terminale (séquence flag) permettant de compenser la suppression des aa ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage notamment en terme d'activation. Les mécanismes moléculaires ne sont pas détaillés mais permettent tout de même de conclure sur l'importance de la séquence (et donc du repliement) du Nter dans la fonctionnalité du récepteur. Les interactions du Nter avec le reste du récepteur 5-HT_{2B} que nous proposons confortent ce constat. Dans notre cas c'est une augmentation du couplage que nous observons. Il faudrait également vérifier si la présence du SNP affecte la glycosylation ou l'expression membranaire. A priori, mais il faudra le vérifier, le SNP n'affecte pas la glycosylation, les résidus affectés en général étant des asparagines (N-glycosylation) ou des sérines/thréonines (O-glycosylation).

La participation du Nter (et de l'ECL2) a été envisagé dans le cas du H₂-R pour expliquer la sélectivité pharmacologique entre le récepteur humain et celui du cochon d'inde (Strasser *et al.*, 2008).

Dans le cas des récepteurs humain au neuropeptide Y (hY₁ à hY₅), le Nter semble jouer un rôle différent dans chaque sous-type (Lindner *et al.*, 2009). Le cas des récepteurs à neuropeptides est particulier pour des RCPG de classe A dans la mesure où les ligands naturels sont des petits peptides de 36 aa. Les résidus impliqués dans le site de liaison des agonistes feraient intervenir en plus des DTM, les boucles extracellulaires. Le rôle du Nter a également été évoqué.

L'expression membranaire est abolie seulement pour les récepteurs hY₁-R et hY₄-R qui n'ont plus de Nter (Δ N). Les auteurs ont choisit de se focaliser sur le hY₂-R pour lequel

l'ablation sélective et progressive du Nter affecte le moins l'affinité et l'efficacité du récepteur alors que pour les autres sous-types le mutant ΔN a une très forte diminution d'affinité (87%) pour le ligand naturel (NPY) mesurée en terme de liaison spécifique et une augmentation très importante de l' EC_{50} par rapport au témoin (8 fois). Les mutations ponctuelles réalisées sur le aa chargés de la partie terminale du Nter du Y_2 -R modifient très faiblement la pharmacologie du récepteur muté. Il s'agissait de montrer que la séquence spécifique du Nter n'influence pas la liaison récepteur/peptide. Le rajout d'une séquence peptidique non spécifique de 9aa à l'extrémité du ΔN augmente la liaison spécifique de 13 % à 27 % et diminue l' EC_{50} de 488 à 42 nM. Les résultats sont bien différents pour la même mutation sur le Nter du hY_5 -R : la liaison spécifique passe de 6 à 9% , l' EC_{50} de 3721 à 238 nM. Alors que pour une même longueur d'aa, le mutant $\Delta Nter+8$ du hY_2 -R a une liaison spécifique de 71 % et un EC_{50} de 9,5 nM. Ces données suggèrent un rôle plus important du Nter que celui de simple châssis moléculaire permettant l'insertion membranaire du DTM1 comme le suggère les auteurs. Le mécanisme moléculaire, s'il avait été proposé, aurait permis d'expliquer l'impact des mutations du Nter sur l'affinité et l'efficacité des ligands et sur l'expression membranaire pour les différents récepteurs. Le choix des mutations à réaliser est dans ce cas plus difficile car aucune mutation ou SNP n'a été décrit en pathologie.

L'impact notable sur l'internalisation (agoniste dépendant) n'intervient que pour des délétions très importantes du Nter. La séquence spécifique de chaque Nter ne semble pas pouvoir expliquer les différences dans la vitesse d'internalisation observé entre les différents h-YRs.

Plus généralement, on peut se demander s'il existe des situations plus proches de la physiologie qui permettent de comprendre le rôle et la capacité du Nter à réguler l'activité constitutive d'un RCPG. La présence d'un fragment protéique dans le milieu extracellulaire où agissent nombres de protéases permet d'envisager une éventuelle protéolyse de la partie N-terminale. Le clivage du Nter a d'ailleurs été décrit *in vitro* pour plusieurs RCPG. Le clivage réalisé par des métalloprotéases comme les MMPs est connu en biologie depuis longtemps mais n'a jamais été réellement envisagé comme un mécanisme de régulation pour les RCPG. Or, il semblerait que le Nter du β_1 -AR soit clivé de manière constitutive (Hakalahti *et al.*, 2010). Plusieurs clivages ont été mis en évidence et concernent la forme mature (glycosylée) du récepteur. Le clivage prépondérant aboutit à la formation d'un récepteur dont les 31 aa du Nter sont absents

(clivage entre R31-L32). Ce clivage réalisé *in vitro*, est confirmée *in vivo*. L'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs de métalloprotéases (GM6001) ou sélectif de TACE (ou ADAM17, enzyme de conversion du TNF- α) réduit la proportion de récepteurs clivés. Le clivage réalisé par une MMP est un processus régulé qui fait intervenir la PKC et dépend de la production d'AMP_c. L'ajout d'un agoniste du récepteur comme l'isoprotérénol augmente le clivage. Le processus semble très dépendant de la séquence spécifique du Nter : ainsi le mutant R31H-L32A est moins clivé que le WT. Sans que l'on sache exactement pourquoi, l'expression basale de ce mutant est augmentée, expression qui diminue après ajout de l'agoniste. L'absence de caractérisation pharmacologique (affinité, efficacité, internalisation) du fragment clivé et du mutant ne permettent pas de proposer de rôle précis pour le N-ter. Il pourrait bien s'agir d'une forme de régulation fonctionnelle de l'activité des RCPG.

On peut envisager de même un clivage du 5-HT_{2B}R. En effet, le récepteur est capable d'activer et réguler l'activité enzymatique de TACE (Pietri *et al.*, 2005).

Les MMP mais surtout les protéases comme la thrombine sont connus depuis longtemps pour cliver la partie N-terminale et provoquer l'activation des PAR. Le mécanisme d'activation de ces RCPG est original: le clivage démasque une séquence peptidique capable d'activer le récepteur (pour revue voir Soh *et al.*, 2010). Dans le cas du PAR1, la thrombine clive la partie N-terminale en R41-S42 et libère une séquence peptidique contenant le ligand enchâssé (ou *tethered ligand*) SFLLRN. Les études structurales concernant le mécanisme d'activation sont encore peu nombreuses. Il semblerait que ce motif interagisse après clivage avec le reste du Nter avant de venir activer le récepteur (Seeley *et al.*, 2003).

Les résultats que nous venons de discuter montrent les nombreux rôles du Nter dont celui de régulateur de l'activité constitutive et ouvrent de nombreuses perspectives. De nombreuses questions restent néanmoins en suspens. Les nouvelles données structurales disponibles devraient permettre de poursuivre l'étude de modélisation pour caractériser les interactions entre Nter, ECL et DTM pour les étendre ensuite éventuellement aux boucles intracellulaires de la partie C-terminale. Le rôle des protéines G et l'interaction qu'elles réalisent au niveau de cette partie sont fondamentales pour comprendre la régulation de l'activité constitutive. Nous allons étudier l'effet joué par le Nter sur des interactions clés comme celles dépendant des motifs DRY et NPXXY en nous intéressant au rôle d'Y380 dans l'interaction D100-N376.

Pour ce faire, nous pourrions utiliser la technique de dynamique moléculaire sous contrainte utilisé pour le 5-HT_{2A}R (Isberg *et al.*, 2011). Nous utiliserons les mutants déjà réalisés dans l'étude du site de liaison de la 5-HT (Manivet *et al.*, 2002) pour quantifier l'impact sur l'activité constitutive. Nous compléterons cette étude par l'étude de liaison du récepteur avec un agoniste inverse qui est le ligand de choix pour l'étude de l'activité constitutive.

Cette étude de modélisation pourra s'appuyer sur les résultats de l'étude RMN qui est menée actuellement au laboratoire de structure/activité SABNP d'Evry. Dans un premier temps l'existence de structures secondaires pour le Nter sera recherchée en milieu aqueux puis en micelles par dichroïsme circulaire. L'effet stabilisant des bicelles permettra peut être d'obtenir un meilleur repliement qui pourra permettre de passer à l'étude RMN en micelles. Celle-ci permettra d'étudier directement les interactions N-ter/ECL (voir l'exemple du hY₁-R Walser *et al.*, 2011). Cette étude sera menée en parallèle pour le récepteur sauvage et pour le SNP.

Le profil pharmacologique complet du SNP et du ΔNter sera réalisé avec mesure de l'adressage membranaire, exploration des voies d'internalisation et des conséquences sur la désensibilisation. La question est d'expliquer comment le Nter muté peut conduire à une augmentation de l'activité constitutive et/ou agoniste-dépendante du récepteur. Ceci va également inclure l'impact du SNP sur l'activité et la régulation du SERT (phosphorylations, internalisation).

4.5.2. Le 5-HT_{2B}R dans l'hypothèse sérotoninergique de l'HTAP médicamenteuse

Nous avons présentés différentes hypothèses à l'origine des différentes formes d'HTAP. Le système sérotoninergique y joue un rôle important notamment dans le cas des HTAP d'origine médicamenteuse. Outre le rôle du SERT ou de récepteurs sérotoninergiques comme le récepteur 5-HT_{1B}, le rôle du récepteur 5-HT_{2B} émerge dans les HTAPs induites par l'utilisation d'anorexigènes en clinique humaine. L'histoire de l'HTAP induite par ces molécules utilisées dans plusieurs pays européens comme anorexigènes remonte au début des années 70 avec l'aminorex. L'augmentation importante des cas d'HTAP observée à l'époque a entraîné son interdiction quelques années plus tard. En effet, ces molécules augmentaient d'environ 10 fois le risque de développer une HTAP. De façon surprenante, l'administration américaine du médicament autorisa en 1996, l'utilisation

de dérivés de la fenfluramine pour les retirer du marché en 1999 suite à l'apparition de valvulopathies.

Afin de remettre en perspective l'impact de la découverte du SNP et le rôle du 5-HT_{2B}R dans l'HTAP médicamenteuse, un bref rappel des faits s'impose. En France, il s'agit initialement de l'isoméride® (dexfenfluramine) prescrit comme anorexigène depuis 1985. Les premiers cas d'HTAP induites par les dérivés fenfluraminiques quelques années après dans le service de Pneumologie de l'hôpital Bécclère qui accueille le centre de référence sur l'hypertension pulmonaire. L'isoméride était prescrit en général chez de femmes sans réel problème de surpoids à la différence de sa molécule sœur le benfluorex (Médiator®). Malgré la gravité des cas de valvulopathies décrits, ce n'est qu'avec le cas du benfluorex et l'affaire du Médiator® que la toxicité cardiovasculaire extrêmement grave des anorexigènes devient une question de santé publique en France. En effet, plus de 5 millions de patients ont été traités par ce médicament depuis sa mise sur le marché. Au moment de sa suspension par l'AFSAPPS en novembre 2009, 300 000 patients étaient encore sous traitement.

Malgré de nombreuses données disponibles dans la littérature scientifique, la communauté médicale « fut alertée trop tard » selon ses termes. Ceci pour diverses raisons, le rôle de l'AFSAPPS et des collusions avec l'industrie pharmaceutique l'explique en partie comme le cas par exemple du Pr J.M. Alexandre, ancien responsable de l'agence du médicament, qui a perçu plus d'un million d'euros comme consultant chez Servier à la sortie de ses mandatures à l'agence du médicament. Comment expliquer le fait que l'AFSAPPS a interdit dès 1995 le Médiator® dans les préparations magistrales pour attendre 4 ans avant d'interdire la vente du comprimé ?

Le benfluorex bénéficiait d'une AMM dans le traitement du diabète et des dyslipidémies et non comme un anorexigène, le laboratoire Servier ayant toujours réfuté les propriétés anorexigènes du benfluorex. Il s'avère que le benfluorex (comme la dexfenfluramine) est métabolisé majoritairement en norfenfluramine, puissant agoniste du 5-HT_{2B}R associé depuis de nombreuses années à l'apparition de valvulopathies (Fitzgerald *et al.*, 2000).

Auditionné par la commission des affaires sociales du Sénat en mai 2011, les médecins Marc Humbert et Gérald Simmoneau, référents sur l'HTAP en France, avec qui nous collaborons depuis de nombreuses années, ont rappelé que le taux d'incidence des patients ayant pris du benfluorex (en relais de la dexfenfluramine) n'ont cessé d'augmenter depuis la mise sur le marché du benfluorex. Les données qu'ils avaient déjà

publiées avant l'étude sur le benfluorex faisait état de 9,5 % de cas d'HTAP liés à la prise d'anorexigènes, la fenfluramine représentant 77 % des cas (Souza *et al.*, 2008). Ils ont également montré que la forme clinique d'HTAP induite par les dérivés fenfluraminiques ne diffère pas des autres. Quel rôle joue dans ce cas la prédisposition génétique associée à la mutation de BMPR2 dans la mesure où la présence de mutations de BMPR2 entraîne un raccourcissement du temps d'exposition aux dérivés de la fenfluramine ? 85 cas d'HTAP associés au benfluorex ont été rapportés entre 1999 et 2011 (Humbert *et al.*, 2011). La durée d'exposition est beaucoup plus longue dans le cas du benfluorex par rapport à la dexfenfluramine (30 mois en moyenne). Une autre originalité des cas observés avec le benfluorex est la concomitance de lésions d'HTAP et de valvulopathies (25 % des cas).

Ces données renforcent le rôle de plus en plus probable du récepteur 5-HT_{2B} dans l'HTAP et les valvulopathies cardiaques. Nos travaux sur le rôle du SNP devraient nous permettre de mieux comprendre les caractéristiques et les déterminants de cette forme d'HTAP.

D'abord évoqué, le rôle déclenchant de l'augmentation de la 5-HT a été progressivement remis en question. La libération de 5-HT provoquée par l'administration de fenfluramine et la participation du SERT ne permettent pas à eux seuls d'expliquer les modifications vasculaires observées. En réalité, l'activation du récepteur 5-HT_{2B} contrôle les taux plasmatiques de 5-HT (Callebert *et al.*, 2006). La question reste donc posée concernant le rôle de la dexfenfluramine et de son métabolite, qui utilisés à concentration thérapeutique, ne permettent d'augmenter les taux plasmatiques de 5-HT qu'en conditions hypoxiques (Launay *et al.*, 2006). Chez la souris, l'augmentation des concentrations de 5-HT plasmatique est proportionnelle à la durée de l'hypoxie: 30 nM à 2 semaines et 60 nM à 5 semaines. L'ajout de dexfenfluramine permet d'augmenter les taux de 5-HT plasmatiques (175 nM à 5 semaines). La réponse à l'hypoxie observée est dépendante du récepteur 5-HT_{2B}. A l'inverse, l'augmentation brève de la 5-HT mesurée après injection de dexfenfluramine n'est pas contrôlée par le récepteur. Deux mécanismes distincts, avec ou sans participation du SERT, ont été évoqués. Ces résultats sont confirmés en conditions normoxiques avec des valeurs de 5-HT plasmatique qui varient entre 20 et 40 nM après des injections chroniques de fenfluramine (Zolkowska *et al.*, 2008). Il s'agit de savoir si les taux de 5-HT plasmatique obtenus en présence de fenfluramine (métabolisée en norfenfluramine) sont suffisants pour obtenir le

remodelage vasculaire observé dans l'HTAP et de s'interroger sur le rôle de l'hypoxie. A ces concentrations (entre 10 et 100 nM), la 5-HT ne provoque pas de contractions des artères pulmonaires mais serait suffisant pour un effet mitogénique sur les cellules musculaires lisses pulmonaires (Zolkowska *et al.*, 2006). Chez les malades avec différentes causes d'HTAP (dont la prise de fenfluramine), les taux plasmatiques de 5-HT étaient de 30.1 ± 9.2 nM (Hervé *et al.*, 1995). Ces valeurs moyennes relativement «faibles » n'excluent pas des fluctuations importantes chez les patients.

Pour rappel, les taux physiologiques de la norfenfluramine (métabolite actif de la dexfenfluramine et de la nordexfenfluramine) obtenus après injection chez des volontaires sains sont submicromolaires (Caccia *et al.*, 1985). Des taux équivalents ont permis à Launay et coll. de mesurer une augmentation de prolifération *in vivo* après injection de dexfenfluramine pendant 5 semaines à des souris sous hypoxie (Launay *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données complexes sur l'implication des anorexigènes dans l'HTAP semble converger vers le récepteur 5-HT_{2B}. Dans ce contexte, plusieurs investigations restent à effectuer pour préciser l'impact réel du SNP du 5-HT_{2B}R dans la physiopathologie de l'HTAP. Le séquençage du récepteur chez les nombreux patients exposés au benfluorex qui sont à risque de développer une HTAP (ou une valvulopathie) pourrait permettre de comprendre les causes et les différences à l'origine des deux tableaux cliniques. Comment expliquer par exemple la présence simultanée d'HTAP et de valvulopathies chez les patients ayant pris du benfluorex. Pour ce faire, nous allons poursuivre notre collaboration avec M. Humbert et G. Simmoneau en commençant par évaluer le génotype de la cohorte des 85 cas de patients HTAP ayant pris du benfluorex. Ceci pour évaluer si le SNP (à l'état homozygote) n'est présent que chez les malades atteints d'HTAP induite par les anorexigènes. Ceci sera complété par l'étude des répercussions du SNP sur les différents modèles expérimentaux disponibles (hypoxie, injection à la monocrotaline).

De plus, une exploration génétique du 5-HT_{2B}R chez des patients atteints de valvulopathies est nécessaire pour mieux cerner les différences entre les 2 pathologies. Il s'agit peut être d'une question de susceptibilité individuelle faisant intervenir des gènes différents. En effet, d'autres molécules à l'origine de valvulopathies après activation de 5-HT_{2B}R ont été décrites (Figure 21) avec des K_i et des EC₅₀ nanomolaires sans pour autant provoquer une HTAP (pour revue voir Hutcheson *et al.*, 2011). Les

délais d'apparition des lésions valvulaires semblent plus courts (quelques mois). En termes d'acteurs moléculaires, la grande majorité des études se focalisent sur le récepteur 5-HT_{2B}R et sur le 5-HT_{1B}R. Peu de données génétiques sont disponibles (aucune pour le 5-HT_{1B}R) pour expliquer les différences de phénotype. Au niveau clinique, une étude récente cas-contrôle réalisée en France confirme l'imputabilité du benfluorex dans les valvulopathies mitrales « inexpliquées » (Frachon *et al.*, 2010). Les données épidémiologiques très récentes sur les valvulopathies causées par le benfluorex estiment à 1300 le nombre de morts et à 3000 les hospitalisations suite à l'utilisation du benfluorex (Fournier *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous allons envisager de collaborer avec Irène Frachon qui travaille depuis de nombreuses années sur les questions de valvulopathies.

Le rôle du SNP doit également être interprété à la lumière des autres mutations décrites dans l'HTAP. Pour rappel, la seule et unique mutation retrouvée pour le 5-HT_{2B}R associée à la prise d'anorexigène concernait la partie carboxy-terminale (R393X) (Blanpain *et al.*, 2003). Présente de manière hétérozygote chez une patiente ayant consommé pendant 9 mois de la fenfluramine, la mutation n'a entraîné l'apparition de symptômes que 5 ans après. Le profil pharmacologique complet réalisé montre une perte du couplage G_q associé à une augmentation de la prolifération par le recrutement de la voie des MAPK (Deraet *et al.*, 2005).

Aucune mutation de la protéine BMPR2 n'a été retrouvée chez les 10 patients testés dans cette étude. La question des interactions entre les voies 5-HT et les altérations génétiques de la protéine BMPR2 reste posé. Chez la souris, la perte d'un allèle *BMPR2* augmente la prolifération et la RVP après l'injection chronique de 5-HT (Long *et al.*, 2006). De plus, la 5-HT est capable d'interagir *in vitro* avec la voie BMP en activant la phosphorylation de protéines effectrices (Smad1/5/8). Les détails concernant les mécanismes de régulation de cette voie ne sont pas encore bien compris, notamment les conséquences chez les patients porteurs d'une mutation BMPR2.

On peut alors se demander si le SNP que nous décrivons n'est pas un facteur de susceptibilité d'HTAP. Pour l'instant, le SNP ne semble pas être un mutant inductif d'HTAP. Nos données préliminaires ne rapportent pas association entre le statut BMPR et le type d'HTAP (idiopathique ou induite par les anorexigènes) ou la présence d'un SNP (R6G, R6G/E42G, E42G). Pour autant, 60% des patients HTAP ayant consommé des anorexigènes présentes un polymorphisme dans leur partie N-terminale. Un lien existe

chez les malades entre statut du récepteur 5-HT_{2B} et la prise d'anorexigène, l'association de ces facteurs augmentant le risque de développer une HTAP. En ce qui concerne d'autres altérations génétiques du signalosome sérotoninergique, nous avons repris l'étude des polymorphismes du SERT (Annexe 3). Nous avons d'abord étudié la distribution des différents polymorphismes du SERT entre les malades HTAP et la population témoin. Aucune différence significative pour la distribution des différents polymorphismes du promoteur (ll, ls, ss) et ceux de l'intron 2 (9/12 ; 10/10, 10/12, 12/12) n'a été mise en évidence entre les deux populations (Annexe 3a). Dans un deuxième temps, nous avons analysé ces résultats selon la présence ou non d'un (ou plusieurs) SNP(s) au niveau de la partie N-terminale du récepteur 5-HT_{2B}. Les résultats montrent des associations de phénotypes différents dans les 2 populations (Annexe 3b). Chez les patients porteur d'un SNP, les génotypes du promoteur et de l'intron 2 ne sont pas indépendants, l'allèle 10 étant associé aux mutations du *HTR2B*.

Nous avons évoqué différentes perspectives concernant l'HTAP induite par les anorexigènes. De nombreuses questions restent en suspens. Comment expliquer l'apparition d'HTAP chez des patients qui ne sont pas en conditions hypoxiques permanentes ? Il faudrait approfondir cette piste entre hypoxie et système sérotoninergique dans le contexte du SNP (pour revue voir Esteve *et al.*, 2007). Quel va être l'impact de l'hypoxie sur les résultats de prolifération déjà observés *in vitro* sur le SNP en conditions normoxiques ? La présence d'un modèle animal exprimant le récepteur muté permettra de confirmer ou d'infirmer les observations faites chez les souris 5-HT_{2B}R^{-/-} (Launay *et al.*, 2002) dans le but de s'interroger sur le rôle de l'hypoxie dans l'apparition de la maladie. On sait que l'hypoxie chronique comme la vie en altitude entraîne une HTAP réversible. On peut cependant se demander si l'hypoxie chronique utilisée dans les modèles animaux existe chez les malades ou s'il s'agit plutôt d'épisodes hypoxiques aigus qui se répètent. L'apparition d'HTAP chez 6% des patients atteints de drépanocytose (Parent *et al.*, 2011) est une piste intéressante. En effet, le rôle de l'hypoxie dans l'apparition des crises sévères de cette maladie est connu depuis longtemps. Le lien entre hypoxie et HTAP est renforcé par les résultats publiés récemment par Launay et coll. : l'HTAP semble être en réalité une maladie hématologique qui fait intervenir le 5-HT_{2B}R dans la différenciation de cellules souches et la migration de la moelle osseuse vers l'endothélium pulmonaire (Launay *et al.*, 2012). De nombreux processus s'accompagnent d'une hypoxie comme le développement fœtal

et la différenciation médullaire. Le lien entre hypoxie, HTAP et développement est fait par les multiples rôles du récepteur 5-HT_{2B}R. Dans ce contexte, quel va être l'impact du SNP sur le développement des précurseurs médullaires et sur l'hématopoïèse ? Il serait donc judicieux d'explorer les fonctions hématologiques chez les patients porteurs des différentes formes du SNP et d'observer l'activité constitutive et stimulée dans un environnement pauvre en 5-HT par la réalisation d'un profil pharmacologique exhaustif du récepteur dans la moelle. En effet, l'absence du récepteur par invalidation génétique dans la moelle perturbe la différenciation des cellules souches (Launay *et al.*, 2012).

4.5.3. Données récentes sur le rôle du 5-HT_{2B}R dans l'addiction

A la suite de l'identification d'un SNP dans une population d'HTAP ayant pris des anorexigènes, nous avons voulu expliquer la présence majoritaire du SNP R6G/E42G dans une population de malades ayant consommé des anorexigènes comme la fenfluramine et être sûr de ne pas être en présence d'un variant non inductif d'HTAP. En d'autres termes, est ce que le SNP n'est pas lié aux propriétés de la fenfluramine et de ses dérivés ? L'action de la fenfluramine et de ses dérivés se distingue de celle des amphétamines classiques. Son action repose principalement sur les voies sérotoninergiques et sur des effets périphériques responsables de son action anorexigène. Les données récentes sur le rôle de la 5-HT sur la régulation de la synthèse d'insuline plaident en ce sens (Paulmann *et al.*, 2009). Ses dérivés exercent beaucoup moins d'effets psychostimulants centraux, effets qui se manifestent à forte dose avec des effets hallucinatoires intenses associés à une diminution de l'euphorie. Le risque de toxicomanie reste faible pour ces molécules même si le risque de dépendance existe (pour revue voir Rothman *et al.*, 2000).

Pour objectiver un éventuel lien entre le récepteur et l'addiction aux substances psychostimulantes, nous avons réalisé une étude préliminaire sur une série de patients toxicomanes (service de psychiatrie du Pr. Lépine). Les résultats montrent de façon surprenante une absence de variant autre que les homozygotes R6G/E42G dans la cohorte d'addicts. Parmi les 73 patients, 20 % sont homozygotes pour le SNP. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour approfondir ces résultats. Une seule étude avant la notre avait proposé une association sur 3 patients entre un variant

du récepteur 5-HT_{2B} (R6G/E42G) et la consommation de psychostimulants (Lin *et al.*, 2004). Cette étude nous a permis de questionner le rôle du SNP entre vulnérabilité et prédisposition, question qui fait débat depuis longtemps dans le domaine de l'addiction aux stupéfiants. Quel rôle le génome a-t-il dans l'accoutumance, la dépendance voire dans l'addiction de ces molécules psychostimulantes ? En effet, l'addiction est difficile à définir. Elle peut être définie comme une succession de choix dommageables à l'individu qui le poussent à continuer par exemple la consommation d'une substance dont il sait qu'elle est toxique et néfaste pour lui (pour revue voir Redish *et al.*, 2008). En replaçant les choses dans leur contexte, on se rend compte qu'il est question ici d'un phénomène plus ou moins rare par rapport aux nombres de consommateurs. L'addiction à la cocaïne par exemple ne concerne que 5-6 % des consommateurs à 2 ans (O'Brien *et al.*, 2005). L'étude clinique est rendue d'autant plus difficile que les cohortes de patients sont très souvent inhomogènes (poly-consommations, doses et durées d'exposition, mécanismes d'action du stupéfiant, etc...). La question du rôle génétique est de plus en plus importante ces dernières années dans les études d'addiction aux stupéfiants. On note une tendance à interpréter nombre de résultats sans grande précaution et à affirmer le lien entre un gène et une « addiction » (pour revue sur les études d'association en génétique voir Hattersley *et al.*, 2005). On pourrait citer l'exemple dans le système sérotoninergique des polymorphismes du SERT décrits comme facteur de risque d'alcoolisme, de dépression, de suicide, et nombre d'autres troubles psychiatriques. Jusqu'à présent, il n'a jamais été trouvé d'association avec l'addiction et les polymorphismes du SERT (allèles L ou S) (Patkar *et al.*, 2002). Les résultats d'imagerie réalisées par PET scan sur des volontaires sains ne montrent pas de différence basées sur les variations alléliques (Murthy *et al.*, 2010). Ces méthodes ouvrent une nouvelle voie pour les études fonctionnelles des polymorphismes .

Les études sur l'addiction concernant le 5-HT_{2B}R ne sont pas nombreuses. Les résultats obtenus pour le MDMA chez les souris invalidées génétiquement par l'équipe de L. Maroteaux montre que les effets hyperlocomoteurs du MDMA (plus connu sous le nom d'ecstasy) sont 5-HT_{2B}R dépendants chez la souris (Doly *et al.*, 2008). L'augmentation de la 5-HT au niveau des noyaux accumbens est inhibée par l'invalidation génétique ou par l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B}. Le MDMA a la particularité (i) de se lier au SERT de manière sélective (par rapport au transporteur de la dopamine) et inverse le sens de transport, entraînant la libération de 5-HT dans la fente et (ii) d'être

un agoniste puissant du récepteur 5-HT_{2B}. Une deuxième étude montre que les effets de sensibilisation comportementale du MDMA à différents tests d'addiction (test de préférence de place conditionnée) sont médiés par le récepteur 5-HT_{2B} (Doly *et al.*, 2009). La libération de dopamine après injection de forte dose de MDMA est également contrôlée par le récepteur 5-HT_{2B}. Le rôle des voies dopaminergiques est primordiale dans la mise en place des comportements addictifs mais ceux-ci font donc également intervenir les voies sérotoninergiques.

Le MDMA a beaucoup plus d'affinité pour le SERT que pour les autres transporteurs. De plus, l'addiction au MDMA est vraiment particulière : elle est considérée comme une drogue « festive », moins addictogène que la cocaïne ou l'héroïne. Il est donc difficile d'extrapoler pour l'instant sur le rôle du 5-HT_{2B}R (ou du SERT) dans l'addiction en général. Des questions restent encore en suspens. Quelle sera l'impact du SNP sur l'effet du MDMA ou d'autres drogues comme la cocaïne et l'héroïne au niveau central ? Peu de traitements sont actuellement disponibles si on prend l'exemple de la dépendance à la cocaïne, les SSRI ou d'autres classes d'antidépresseurs ne donnent pas de résultats probants (pour une méta-analyse exhaustive sur le sujet voir Pani *et al.*, 2011). Peut-on envisager alors de développer une molécule conçue spécialement pour les patients porteurs du SNP ? Ces problématiques sont au cœur de la médecine personnalisée qui veut offrir une thérapie ciblée à chaque malade et non poursuivre la quête d'un hypothétique séquençage systématique des populations comme les méthodes globales (GWAS) pour établir la prédisposition, la susceptibilité génétique voire des corrélations singulières (voir l'exemple avec l'intelligence humaine Deary *et al.*, 2012).

5. Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence plusieurs variants dans la partie N-terminale en position R6G, E42G chez des patients HTAP ayant consommé des anorexigènes dérivé de la fenfluramine. Ce résultat permet de renforcer les liens entre cette maladie grave et le récepteur 5-HT_{2B}.

L'étude de modélisation que j'ai réalisé a permis de montrer que des résidus chargés du Nter dont le SNP (E6G/E42G) sont capables d'interagir avec des résidus impliqués dans le site de liaison des agonistes (D135, E363). Ce mécanisme d'interaction singulier parmi les RCPG de classe A entre la partie N-terminale et le reste du récepteur expliquerait l'augmentation de la prolifération et de l'activité constitutive observée *in vitro*. Ainsi, nous proposons un rôle du Nter dans le contrôle de l'activité intrinsèque dont nous avons discuté les différentes implications dans l'HTAP, la fonction des RCPG et le rôle dans l'addiction du récepteur 5-HT_{2B}. Des études complémentaires doivent être envisagées notamment en pharmacologie et en biologie structurale (RMN) pour terminer la caractérisation du SNP. La modélisation d'autres parties fondamentales du récepteur comme la partie C-terminale ainsi que l'interaction avec des partenaires comme les protéines G (ou les β -arrestines) reste à faire.

Plus généralement, compte tenu du rôle pléthorique du récepteur 5-HT_{2B} et son importance notamment dans le développement, la découverte de SNP reste, pour l'instant, de l'ordre de l'exception. Ce qui s'explique probablement par le fait que peu de mutations soient viables pour ce récepteur.

Conclusion Générale

Nous avons montré deux exemples d'application de la modélisation moléculaire qui permettent de répondre à des degrés divers aux problématiques physiopathologiques posées à l'hôpital.

Concernant la maladie de Wilson, il s'agissait de proposer un outil de diagnostic génétique dans une maladie à la physiopathologie assez bien comprise et disposant d'un traitement. Pourtant, des incertitudes demeuraient concernant le mécanisme et les résidus participant à la liaison de l'ATP au domaine N de l'ATP7B. La modélisation a permis de trancher concernant le rôle de l'ion magnésium dans la liaison au domaine N et de prédire un site d'interaction pour l'ATP qui a pu être confirmé expérimentalement. Des questions restent posées quant au rôle de la longue boucle (A1114-T1143). Les avancées conséquentes obtenues dans la compréhension de la dynamique de la protéine sauvage nous serviront ensuite pour la réalisation et l'interprétation des mutants.

Concernant l'hypertension artérielle pulmonaire et le rôle du récepteur 5-HT_{2B} (5-HT_{2BR}), l'étude de modélisation moléculaire permet d'expliquer les modifications pharmacologiques observées pour un SNP (R6G/E42G) de la partie N-terminale du 5-HT_{2BR} dans un contexte où la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire n'est pas entièrement comprise. De plus, la modélisation moléculaire propose ici un mécanisme d'action inédit de la partie N-terminale qui permet d'envisager un rôle nouveau de la partie N-terminale des récepteurs couplés aux protéines G de classe A dans le contrôle de l'activité intrinsèque de ces récepteurs. Nous proposons une interaction directe de la partie N-terminale dans le site de liaison du récepteur. Nos prédictions ont été en partie validées expérimentalement.

En conclusion, la modélisation moléculaire émerge comme un outil supplémentaire dont nous avons montré le potentiel dans le cadre de travaux de recherche menés à l'hôpital. Plus généralement, un choix judicieux parmi les différents outils de modélisation (DM, minimisation, amarrage moléculaire, chimie quantique) permet dorénavant d'envisager de nouvelles perspectives en particulier en complément de la génétique moléculaire.

Références bibliographiques

- Achila, D., Banci, L., Bertini, I., Bunce, J., Ciofi-Baffoni, S., Huffman, D.L. Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5729-5734 (2006).
- Adcock, S.A., McCammon, J.A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev* **106**, 1589-1615 (2006).
- Adir, Y., Humbert, M. Pulmonary hypertension in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Eur Respir J* **35**, 1396-1406 (2010).
- Ala, A., Walker, A.P., Ashkan, K., Dooley, J.S., Schilsky, M.L. Wilson's disease. *The Lancet* **369**, 397-408 (2007).
- Alewijnse, A.E., Timmerman, H., Jacobs, E.H., Smit, M.J., Roovers, E., Cotecchia, S., Leurs, R. The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor. *Mol Pharmacol* **57**, 890-898 (2000).
- Allinger, N.L., Yuh, Y.H., Lii, J.H. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *J Am Chem Soc* **111**, 8551-8566 (1989).
- Allinger, N.L., Chen, K., Lii, J.-H. An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons. *J Comput Chem* **17**, 642-668 (1996).
- Amireault, P., Hatia, S., Bayard, E., Bernex, F., Collet, C., Callebert, J., Launay, J.M., Hermine, O., Schneider, E., Mallet, J., Dy, M., Côté, F., Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13141-13146 (2011).
- Andrade R., Barnes N.M., Baxter G., Bockaert J., Branchek T., Cohen M. L., Dumuis A., Eglen R.M., Göthert M., Hamblin M., Hamon M., Hartig P.R., Hen R., Herrick-Davis K., Hills R., Hoyer D., Humphrey P. P. A., Latté K.-P., Maroteaux L., Martin G. R., Middlemiss D.N., Mylecharane E., Peroutka S. J., Saxena P. R., Sleight A. 5-Hydroxytryptamine receptors. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/PRODDATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>. (2011).
- Andricioaei, I., Karplus, M. On the calculation of entropy from covariance matrices of the atomic fluctuations. *J Chem Phys* **115**, 6289-6292 (2001).
- Archer, S., Weir, E., Wilkins, M., Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H570-H578 (2007).
- Archer, S., Weir, E., Wilkins, M. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* **121**, 2045-2066 (2010).
- Asberg, A., Hveem, K., Thorstensen, K., Ellekjer, E., Kannelonning, K., Fjosne, U., Halvorsen, T.B., Smethurst, H.B., Sagen, E., Bjerve, K.S., Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* **36**, 1108-1115 (2001).
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**, 84-101 (1998).
- Ballesteros, J.A., Jensen, A.D., Liapakis, G., Rasmussen, S.G., Shi, L., Gether, U., Javitch, J.A. Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* **276**, 29171-29177 (2001).

- Ballesteros, J.A., Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Meth Neurosci* **25**, 366-428 (1995).
- Balóira, A., Núñez, M., Cifrian, J., Vilariño, C., Ojeda, M., Valverde, D. Polymorphisms in the Serotonin Transporter Protein (SERT) Gene in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Arch bronconeumol* **48**, 77-80 (2012).
- Banas, S., Doly, S., Boutourlinsky, K., Diaz, S., Belmer, A., Callebert, J., Collet, C., Launay, J.M., Maroteaux, L., Deconstructing antiobesity compound action: requirement of serotonin 5-HT_{2B} receptors for dexfenfluramine anorectic effects. *Neuropsychopharmacology* **36**, 423-433 (2011).
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Inagaki, S., Migliardi, M., Rosato, A., The binding mode of ATP revealed by the solution structure of the N-domain of human ATP7A. *J Biol Chem* **285**, 2537-2544 (2010).
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Migliardi, M., Natile, G., Nushi, F., Rosato, A., Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins. *Biochemistry* **48**, 7849-7855 (2009).
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Rosenzweig, A.C., Yatsunyk, L.A. Metal binding domains 3 and 4 of the Wilson disease protein: solution structure and interaction with the copper(I) chaperone HAH1. *Biochemistry* **47**, 7423-7429 (2008).
- Barnes, N., Tsivkovskii, R., Tsivkovskaia, N., Lutsenko, S. The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum. *J Biol Chem* **280**, 9640-9645 (2005).
- Bassil, A., Taylor, C., Bolton, V., Gray, K., Brown, J., Cutler, L., Summerfield, S., Bruton, G., Winchester, W., Lee, K., Sanger, G., Inhibition of colonic motility and defecation by RS-127445 suggests an involvement of the 5-HT_{2B} receptor in rodent large bowel physiology. *Br J Pharmacol* **158**, 252-258 (2009).
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Launay, J.M., Kellermann, O. New views on antidepressant action. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 858-865 (2011).
- Baudry, A., Bitard, J., Mouillet-Richard, S., Locker, M., Poliard, A., Launay, J.M., Kellermann, O., Serotonergic 5-HT_{2B} receptor controls tissue-nonspecific alkaline phosphatase activity in osteoblasts via eicosanoids and phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem* **285**, 26066-26073 (2010).
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M., Kellermann, O. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* **329**, 1537-1541 (2010).
- Baxter, G.S. Novel discriminatory ligands for 5-HT_{2B} receptors. *Behav Brain Res* **73**, 149-152 (1996).
- Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., Belmer, A., Hodgkinson, C., Dell'osso, L., Suvisaari, J., Coccaro, E., Rose, R., Peltonen, L., Virkkunen, M., Goldman, D., A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* **468**, 1061-1066 (2010).
- Bhattacharya, S., Vaidehi, N. Computational mapping of the conformational transitions in agonist selective pathways of a G-protein coupled receptor. *J Am Chem Soc* **132**, 5205-5214 (2010).
- Blanpain, C., Le Poul, E., Parma, J., Knoop, C., Detheux, M., Parmentier, M., Vassart, G., Abramowicz, M.J., Serotonin 5-HT_{2B} receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **60**, 518-528 (2003).

- Bliziotis, M. Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 4124-4132 (2010).
- Bliziotis, M., Eshleman, A., Burt-Pichat, B., Zhang, X.W., Hashimoto, J., Wiren, K., Chenu, C., Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* **39**, 1313-1321 (2006).
- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X., Kamme, F., Meurers, B., Bakker, M., Jurzak, M., Leysen, J.E., Erlander, M.G, Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res* **943**, 38-47 (2002).
- Bonhaus, D.W., Flippin, L.A., Greenhouse, R.J., Jaime, S., Rocha, C., Dawson, M., Van Natta, K., Chang, L.K., Pulido-Rios, T., Webber, A., Leung, E., Eglén, R.M., Martin, G.R., RS-127445: a selective, high affinity, orally bioavailable 5-HT_{2B} receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **127**, 1075-1082 (1999).
- Bonhaus, D.W., Bach, C., DeSouza, A., Salazar, F.H., Matsuoka, B.D., Zuppan, P., Chan, H.W., Eglén, R.M., The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br J Pharmacol* **115**, 622-628 (1995).
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M., King, J., Shih, J., Blakely, R., Deneris, E., Levitt, P., A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* **472**, 347-350 (2011).
- Borjigin, J., Payne, A.S., Deng, J., Li, X., Wang, M.M., Ovodenko, B., Gitlin, J.D., Snyder, S.H., A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene. *J Neurosci* **19**, 1018-1026 (1999).
- Borman, R.A., Tilford, N.S., Harmer, D.W., Day, N., Ellis, E.S., Sheldrick, R.L.G., Carey, J., Coleman, R.A., Baxter, G.S., 5-HT_{2B} receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *Br J Pharmacol* **135**, 1144-1151 (2002).
- Bramkamp, M., Altendorf, K., Greie, J.C. Common patterns and unique features of P-type ATPases: a comparative view on the KdpFABC complex from *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol* **24**, 375-386 (2007).
- Brand, T., Anderson, G.M. The measurement of platelet-poor plasma serotonin: a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem* **57**, 1376-1386 (2011).
- Brooks, B.R., Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* **4**, 187-217 (1983).
- Buc-Caron, M.H., Launay, J.M., Lamblin, D., Kellermann, O. Serotonin uptake, storage, and synthesis in an immortalized committed cell line derived from mouse teratocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1922-1926 (1990).
- Buiakova, O.I., Xu, J., Lutsenko, S., Zeitlin, S., Das, K., Das, S., Ross, B.M., Mekios, C., Scheinberg, I.H., Gilliam, T.C, Null mutation of the murine ATP7B (Wilson Disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet* **8**, 1665-1671 (1999).
- Caccia, S., Conforti, I., Duchier, J., Garattini, S. Pharmacokinetics of fenfluramine and norfenfluramine in volunteers given D- and DL-fenfluramine for 15 days. *Eur J Clin Pharmacol* **29**, 221-224 (1985).
- Callebert, J., Esteve, J.M., Hervé, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Drouet, L., Launay, J.M., Maroteaux, L., Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **317**, 724-731 (2006).
- Cater, M.A., La Fontaine, S., Mercer, J.F. Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *Biochem J* **401**, 143-153 (2007).

- Chabbi-Achengli, Y., Coudert, A.E., Callebort, J., Geoffroy, V., Côté, F., Collet, C., de Vernejoul, M.C. Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 2567-2572 (2012).
- Chambers, C.D., Hernandez-Diaz, S., Van Marter, L.J., Werler, M.M., Louik, C., Jones, K.L., Mitchell, A., Selective Serotonin-Reuptake Inhibitors and Risk of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *N Engl J Med* **354**, 579-587 (2006).
- Chappuis, P., Bost, M., Misrahi, M., Duclos-Vallee, J.C., Woimant, F. La maladie de Wilson : aspects clinicobiologiques. *Ann Biol Clin (Paris)* **63**, 457-466 (2005).
- Chappuis, P., Bost, M., Misrahi, M., Lachaux, A., Duclos-Vallée, J., Debray, D., Trocello, J., Woimant, F., Exploration biologique de la maladie de Wilson. *Revue Francophone des Laboratoires* **2007**, 37-44 (2007).
- Chien, E., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M., Shi, L., Newman, A., Javitch, J., Cherezov, V., Stevens, R., Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **330**, 1091-1095 (2010).
- Cho, D., Min, C., Jung, K., Cheong, S., Zheng, M., Cheong, S., Oak, M., Cheong, J., Lee, B., Kim, K., N-terminal region of dopamine D(2) receptor, a rhodopsin family GPCR, regulates proper integration into plasma membrane and endocytic routes. *Br J Pharmacol* (2011).
- Choi, D., Birraux, G., Launay, J.M., Maroteaux, L. The human serotonin 5-HT2B receptor: Pharmacological link between 5-HT2 and 5-HT1D receptors. *FEBS Lett* **352**, 393-399 (1994).
- Choi, D., Maroteaux, L. Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett* **391**, 45-51 (1996).
- Choi, D., Ward, S., Messaddeq, N., Launay, J.M., Maroteaux, L. 5-HT2B receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* **124**, 1745-1755 (1997).
- Chothia, C., Lesk, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* **5**, 823-826 (1986).
- Clark, M., Cramer, R.D., Van, Opdenbosch, N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *J Comput Chem* **10**, 982-1012 (1989).
- Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy, V., Maroteaux, L., Launay, J.M., de Vernejoul, M.C. The serotonin 5-HT2B receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J* **22**, 418-427 (2008).
- Congreve, M., Langmead, C.J., Mason, J.S., Marshall, F.H. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J Med Chem* **54**, 4283-4311 (2011).
- Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc* **117**, 5179-5197 (1995).
- Corominas, R., Sobrido, M., Ribasés, M., Cuenca-León, E., Blanco-Arias, P., Narberhaus, B., Roig, M., Leira, R., López-González, J., Macaya, A., Association study of the serotoninergic system in migraine in the spanish population. *Am J Med Genet* **153B**, 177-184 (2010).
- Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoché, M.A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J., Vodjdani, G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 13525-13530 (2003).

- Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J.M., Gershon, M.D., Mallet, J., Vodjdani, G. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 329-334 (2007)
- Courboulain, A., Paulin, R., Giguère, N.J., Saksouk, N., Perreault, T., Meloche, J., Paquet, E.R., Biardel, S., Provencher, S., Côté, J., Simard, M.J., Bonnet, S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* **208**, 535-548 (2011).
- Cowan, J.A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* **15**, 225-235 (2002).
- Cui, Y., Niziolek, P., Macdonald, B., Zylstra, C., Alenina, N., Robinson, D., Zhong, Z., Matthes, S., Jacobsen, C., Conlon, R., Brommage, R., Liu, Q., Mseeh, F., Powell, D., Yang, Q., Zambrowicz, B., Gerrits, H., Gossen, J., He, X., Bader, M., Williams, B., Warman, M., Robling Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med* **17**, 684-691 (2011).
- Czlonkowska, A., Gajda, J., Rodo, M. Effects of long-term treatment in Wilson's disease with D-penicillamine and zinc sulphate. *J Neurol* **243**, 269-273 (1996).
- de Bie, P., Muller, P., Wijmenga, C., Klomp, L.W. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* **44**, 673-688 (2007).
- Deary, I.J., Yang, J., Davies, G., Harris, S.E., Tenesa, A., Liewald, D., Luciano, M., Lopez, L.M., Gow, A.J., Corley, J., Redmond, P., Fox, H.C., Rowe, S.J., Haggarty, P., McNeill, G., Goddard, M.E., Porteous, D.J., Whalley, L.J., Starr, J.M., Visscher, P.M. Genetic contributions to stability and change in intelligence from childhood to old age. *Nature* **482**, 212-215 (2012).
- Deraet, M., Manivet, P., Janoshazi, A., Callebert, J., Guenther, S., Drouet, L., Launay, J.M., Maroteaux, L. The natural mutation encoding a C terminus-truncated 5-hydroxytryptamine 2B receptor is a gain of proliferative functions. *Mol Pharmacol* **67**, 983-991 (2005).
- Dhalla, I.A., Juurlink, D.N., Gomes, T., Granton, J.T., Zheng, H., Mamdani, M.M. Selective serotonin reuptake inhibitors and pulmonary arterial hypertension: a case-control study. *Chest* (2012).
- Dmitriev, O., Tsivkovskii, R., Abildgaard, F., Morgan, C.T., Markley, J.L., Lutsenko, S. Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5302-5307 (2006).
- Doly, S., Valjent, E., Setola, V., Callebert, J., Hervé, D., Launay, J.M., Maroteaux, L. Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hyperlocomotion and 5-HT release in vivo and in vitro. *J Neurosci* **28**, 2933-2940 (2008).
- Doly, S., Bertran-Gonzalez, J., Callebert, J., Bruneau, A., Banas, S.M., Belmer, A., Boutourlinsky, K., Hervé, D., Launay, J.M., Maroteaux, L. Role of serotonin via 5-HT_{2B} receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS ONE* **4**, e7952 (2009).
- Duclos-Vallée, J., Ichaï, P., Chappuis, P., Misrahi, M., Woimant, F. [Maladie de Wilson]. *Rev Prat* **56**, 469-474 (2006).
- Dumitrascu, R., Kulcke, C., Königshoff, M., Kouri, F., Yang, X., Morrell, N., Ghofrani, H., Weissmann, N., Reiter, R., Seeger, W., Grimminger, F., Eickelberg, O., Schermuly, R., Pullamsetti, S. Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* **37**, 1104-1118 (2011).
- Duxon, M., Kennett, G., Lightowler, S., Blackburn, T., Fone, K. Activation of 5-HT_{2B} receptors in the medial amygdala causes anxiolysis in the social interaction test in the rat. *Neuropharmacology* **36**, 601-608 (1997).

- Ebrahimkhani, M., Oakley, F., Murphy, L., Mann, J., Moles, A., Perugorria, M., Ellis, E., Lakey, A., Burt, A., Douglass, A., Wright, M., White, S., Jaffré, F., Maroteaux, L., Mann, D., Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT_{2B} receptor in chronic liver disease. *Nat Med* **17**, 1668-1673 (2011).
- Eddahibi, S., Hanoun, N., Lanfumey, L., Lesch, K.P., Raffestin, B., Hamon, M., Adnot, S, Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest* **105**, 1555-1562 (2000).
- Eddahibi, S., Humbert, M., Fadel, E., Raffestin, B., Darmon, M., Capron, F., Simonneau, G., Darteville, P., Hamon, M., Adnot, S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **108**, 1141-1150 (2001).
- El Balkhi, S., Trocello, J., Poupon, J., Chappuis, P., Massicot, F., Girardot-Tinant, N., Woimant, F. Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clin Chim Acta* **412**, 2254-2260 (2011).
- Elfrink, K., Ollesch, J., Stöhr, J., Willbold, D., Riesner, D., Gerwert, K., Structural changes of membrane-anchored native PrP(C). *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10815-10819 (2008).
- Erickson, J.D., Eiden, L.E., Hoffman, B.J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10993-10997 (1992).
- Erickson, J.D., Schafer, M.K., Bonner, T.I., Eiden, L.E., Weihe, E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5166-5171 (1996).
- Esteve, J.M., Launay, J.M., Kellermann, O., Maroteaux, L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys* **47**, 33-44 (2007).
- Ewing, T.J., Makino, S., Skillman, A.G., Kuntz, I.D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des* **15**, 411-428 (2001).
- Farha, S., Asosingh, K., Xu, W., Sharp, J., George, D., Comhair, S., Park, M., Tang, W.H., Loyd, J.E., Theil, K., Tubbs, R., Hsi, E., Lichtin, A., Erzurum, S.C., Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: a link to the intrinsic myeloid abnormalities. *Blood* **117**, 3485-3493 (2011).
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., Gershon, M.D. Serotonin and the 5-HT_{2B} Receptor in the Development of Enteric Neurons. *J Neurosci* **20**, 294-305 (2000).
- Fiser, A., Sali, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Meth Enzymol* **374**, 461-491 (2003).
- Fitzgerald, L.W., Burn, T.C., Brown, B.S., Patterson, J.P., Corjay, M.H., Valentine, P.A., Sun, J.H., Link, J.R., Abbaszade, I., Hollis, J.M., Largent, B.L., Hartig, P.R., Hollis, G.F., Meunier, P.C., Robichaud, A.J., Robertson, D.W. Possible role of valvular serotonin 5-HT_{2B} receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* **57**, 75-81 (2000).
- Foguet, M., Hoyer, D., Pardo, L.A., Parekh, A., Kluxen, F.W., Kalkman, H.O., Stühmer, W., Lübbert, H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J* **11**, 3481-3487 (1992).
- Forbes, J.R., Cox, D.W. Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? *Am J Hum Genet* **63**, 1663-1674 (1998).
- Fournier, A., Zureik, M. Estimate of deaths due to valvular insufficiency attributable to the use of benfluorex in France. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* (2012).
- Frachon, I., Etienne, Y., Jobic, Y., Le Gal, G., Humbert, M., Leroyer, C., Benfluorex and unexplained valvular heart disease: a case-control study. *PLoS ONE* **5**, e10128 (2010).

- Frausto da Silva, J.J.R., Williams, R.J.P. in *The biological chemistry of the elements* pp. 250-277 (Oxford University Press, 1991).
- Futai, M., Wada, Y., H. Kaplan, J. *Handbook of ATPases* (Wiley-VCH, 2004).
- Galés, C., Van Durm, J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., Bouvier, M., Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786 (2006).
- García, A.E., Sanbonmatsu, K.Y. Exploring the energy landscape of a beta hairpin in explicit solvent. *Proteins* **42**, 345-354 (2001).
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4**, 1002-1012 (2003).
- Gitlin, J.D. Wilson disease. *Gastroenterology* **125**, 1868-1877 (2003).
- Gourdon, P., Liu, X., Skjørringe, T., Morth, J.P., Møller, L., Pedersen, B., Nissen, P., Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* **475**, 59-64 (2011).
- Grace, C.R., Perrin, M.H., Gulyas, J., DiGruccio, M.R., Cantle, J.P., Rivier, J.E., Vale, W.W., Riek, R., Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 4858-4863 (2007).
- Günther, S., Maroteaux, L., Schwarzscher, S.W. Endogenous 5-HT_{2B} receptor activation regulates neonatal respiratory activity in vitro. *J Neurobiol* **66**, 949-961 (2006).
- Hakalahti, A.E., Vierimaa, M.M., Lilja, M.K., Kumpula, E.P., Tuusa, J.T., Petäjä-Repo, U.E Human beta1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. *J Biol Chem* **285**, 28850-28861 (2010).
- Hannon, J., Hoyer, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* **195**, 198-213 (2008).
- Hattersley, A.T., McCarthy, M.I. What makes a good genetic association study? *Lancet* **366**, 1315-1323 (2005).
- Hervé, P., Drouet, L., Dosquet, C., Launay, J.M., Rain, B., Simonneau, G., Caen, J., Duroux, P. Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin. *Am J Med* **89**, 117-120 (1990).
- Hervé, P., Launay, J.M., Scrobohaci, M.L., Brenot, F., Simonneau, G., Petitpretz, P., Poubeau, P., Cerrina, J., Duroux, P., Drouet, L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* **99**, 249-254 (1995).
- Hibert, M.F., Trumpp-Kallmeyer, S., Bruinvels, A., Hoflack, J. Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **40**, 8-15 (1991).
- Hinsén, K. Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Proteins* **33**, 417-429 (1998).
- Hironaka, E., Hongo, M., Sakai, A., Mawatari, E., Terasawa, F., Okumura, N., Yamazaki, A., Ushiyama, Y., Yazaki, Y., Kinoshita, O. Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res* **60**, 692-699 (2003).
- Hua, S., Inesi, G., Nomura, H., Toyoshima, C. Fe(2+)-catalyzed oxidation and cleavage of sarcoplasmic reticulum ATPase reveals Mg(2+) and Mg(2+)-ATP sites. *Biochemistry* **41**, 11405-11410 (2002).
- Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F., Rabinovitch, M., Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, 13S-24S (2004).
- Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.F., Chabot, F., Dromer, C., Pison, C., Reynaud-Gaubert, M.,

- Haloun, A., Laurent, M., Hachulla, E., Simonneau, G. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 1023-1030 (2006).
- Humbert, M., Savale, L., Chaumais, M.C., Sitbon, O., Simonneau, G. Benfluorex (Mediator®) et hypertension pulmonaire. *Rapport provisoire du Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère*, Hôpital Antoine Bécclère (2011).
- Hutcheson, J., Setola, V., Roth, B., Merryman, W.D. Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol Ther* **132**, 146-157 (2011).
 - Isberg, V., Balle, T., Sander, T., Jørgensen, F.S., Gloriam, D.E. G protein- and agonist-bound serotonin 5-HT_{2A} receptor model activated by steered molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model* **51**, 315-325 (2011).
 - Jaffré, F., Callebort, J., Sarre, A., Etienne, N., Nebigil, C.G., Launay, J.M., Maroteaux, L., Monassier, L. Involvement of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α cytokine production by ventricular fibroblasts. *Circulation* **110**, 969-974 (2004).
 - Jaffré, F., Bonnin, P., Callebort, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B.C., Launay, J.M., Maroteaux, L., Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ Res* **104**, 113-123 (2009).
 - Janoshazi, A., Deraet, M., Callebort, J., Setola, V., Guenther, S., Saubamea, B., Manivet, P., Launay, J.M., Maroteaux, L. Modified Receptor Internalization upon Coexpression of 5-HT_{1B} Receptor and 5-HT_{2B} Receptors. *Mol Pharmacol* **71**, 1463-1474 (2007).
 - Jensen, F. in *Introduction to Computational Chemistry* pp. 380-412 (Wiley-VCH, 2006).
 - Johnson, K., Nelson, D., Dieckman, D., Wainscott, D., Lucaites, V., Audia, J., Owton, W., Phebus, L., Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT_{2B} receptor activation. *Cephalalgia* **23**, 117-123 (2003).
 - Jonnakuty, C., Gragnoli, C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* **217**, 301-306 (2008).
 - Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **79**, 926-935 (1983).
 - Katz, A., Lifshitz, Y., Bab-Dinitz, E., Kapri-Pardes, E., Goldshleger, R., Tal, D.M., Karlsh, S.J. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **285**, 19582-19592 (2010).
 - Kaumann, A.J., Levy, F.O. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* **111**, 674-706 (2006).
 - Keegan, A., Morecroft, I., Smillie, D., Hicks, M.N., MacLean, M.R. Contribution of the 5-HT_{1B} receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT_{1B}-receptor knockout mice and the 5-HT_{1B/1D}-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* **89**, 1231-1239 (2001).
 - Kellermann, O., Loric, S., Maroteaux, L., Launay, J.M. Sequential onset of three 5-HT receptors during the 5-hydroxytryptaminergic differentiation of the murine 1C11 cell line. *Br J Pharmacol* **118**, 1161-1170 (1996).
 - Kenakin, T. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 186-192 (2004).
 - Kennett, G., Trail, B., Bright, F. Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT_{2B} receptor mediated. *Neuropharmacology* **37**, 1603-1610 (1998).
 - Kenney, S.M., Cox, D.W. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* **28**, 1171-1177 (2007).

- Kéréveur, A., Callebort, J., Humbert, M., Herve, P., Simonneau, G., Launay, J.M., Drouet, L., High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension : effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2233-2239 (2000).
- Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Yang, K., Honig, G., Van Der Hart, M., Kishimoto, N., Wang, J., Yagihashi, S., Tecott, L., Watada, H., German, M, Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* **16**, 804-808 (2010).
- Kim, S., Veenstra-VanderWeele, J., Hanna, G., Gonen, D., Leventhal, B., Cook Jr, E, Mutation screening of human 5-HT_{2B} receptor gene in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Mol Cell Probes* **14**, 47-52 (2000).
- Kim, S.K., Li, Y., Abrol, R., Heo, J., Goddard, W.A. Predicted structures and dynamics for agonists and antagonists bound to serotonin 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *J Chem Inf Model* (2011).
- Kirillova, V.V., Nigmatullina, R.R., Dzhordzhikiya, R.K., Kudrin, V.S., Klodt, P.M. Increased concentrations of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in blood plasma from patients with pulmonary hypertension due to mitral valve disease. *Bull Exp Biol Med* **147**, 408-410 (2009).
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 935-949 (2004).
- Kubala, M. ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments. *Proteins* **64**, 1-12 (2006).
- Kuhlbrandt, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 282-295 (2004).
- Laio, A., Parrinello, M. Escaping free-energy minima. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12562-12566 (2002).
- Lauder, J.M., Wilkie, M.B., Wu, C., Singh, S. Expression of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci* **18**, 653-662 (2000).
- Launay, J.M., Birraux, G., Bondoux, D., Callebort, J., Choi, D.S., Loric, S., Maroteaux, L. Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT_{2B} receptor. *J Biol Chem* **271**, 3141-3147 (1996).
- Launay, J.M., Hervé, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebort, J., Nebigil, C.G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G., Maroteaux, L., Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**, 1129-1135 (2002).
- Launay, J.M., Schneider, B., Loric, S., Da Prada, M., Kellermann, O. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J* **20**, 1843-1854 (2006).
- Launay, J.M., Hervé, P., Callebort, J., Mallat, Z., Collet, C., Doly, S., Belmer, A., Diaz, S., Hatia, S., Côté, F., Humbert, M., Maroteaux, L, Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood* **119**, 1772-1780 (2012).
- Le Coniat, M., Choi, D.S., Maroteaux, L., Launay, J.M., Berger, R. The 5-HT_{2B} receptor gene maps to 2q36.3-2q37.1. *Genomics* **32**, 172-173 (1996).
- Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications* (Prentice Hall, 2001).
- Lechin, F., Coll-Garcia, E., Van Der Dijs, B., Pena, F., Bentolila, A., Rivas, C. The effect of serotonin (5-HT) on insulin secretion. *Acta Physiol Lat Am* **25**, 339-346 (1975).

- Lederer, D.J., Horn, E.M., Rosenzweig, E.B., Karmally, W., Jahnes, M., Barst, R.J., Kawut, S.M., Plasma serotonin levels are normal in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* **21**, 112-114 (2008).
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* **274**, 1527-1531 (1996).
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., Clavien, P, Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science* **312**, 104-107 (2006).
- Levin, M.C., Marullo, S., Muntaner, O., Andersson, B., Magnusson, Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* **277**, 30429-30435 (2002).
- Libert, S., Pointer, K., Bell, E.L., Das, A., Cohen, D.E., Asara, J.M., Kapur, K., Bergmann, S., Preisig, M., Otowa, T., Kendler, K.S., Chen, X., Hettema, J.M., van den Oord, E.J., Rubio, J., Guarente, L. SIRT1 Activates MAO-A in the Brain to Mediate Anxiety and Exploratory Drive. *Cell* **147**, 1459-1472 (2011).
- Limsuwan, A., Pakakasama, S., Rochanawutanon, M., Hong-eng, S. Pulmonary Arterial Hypertension after Childhood Cancer Therapy and Bone Marrow Transplantation. *Cardiology* **105**, 188-194 (2006).
- Lin, Z., Walther, D., Yu, X.Y., Drgon, T., Uhl, G.R. The human serotonin receptor 2B: coding region polymorphisms and association with vulnerability to illegal drug abuse. *Pharmacogenetics* **14**, 805-811 (2004).
- Lindner, D., Walther, C., Tennemann, A., Beck-Sickinger, A.G. Functional role of the extracellular N-terminal domain of neuropeptide Y subfamily receptors in membrane integration and agonist-stimulated internalization. *Cellular Signalling* **21**, 61-68 (2009).
- Liu, Y., Ren, W., Warburton, R., Toksoz, D., Fanburg, B. Serotonin induces Rho/ROCK-dependent activation of Smads 1/5/8 in pulmonary artery smooth muscle cells. *The FASEB J* **23**, 2299-2306 (2009).
- Locker, M., Bitard, J., Collet, C., Poliard, A., Mutel, V., Launay, J.M., Kellermann, O, Stepwise control of osteogenic differentiation by 5-HT(2B) receptor signaling: nitric oxide production and phospholipase A2 activation. *Cell Signal* **18**, 628-639 (2006).
- Long, L., MacLean, M.R., Jeffery, T.K., Morecroft, I., Yang, X., Rudarakanchana, N., Southwood, M., James, V., Trembath, R.C., Morrell, N.W. Serotonin Increases Susceptibility to Pulmonary Hypertension in BMPR2-Deficient Mice. *Circ Res* **98**, 818-827 (2006).
- Loric, S., Launay, J.M., Colas, J.F., Maroteaux, L. New mouse 5-HT2-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett* **312**, 203-207 (1992).
- Loric, S., Maroteaux, L., Kellermann, O., Launay, J.M. Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol* **47**, 458-466 (1995).
- Luheshi, L.M., Dobson, C.M. Bridging the gap: from protein misfolding to protein misfolding diseases. *FEBS Lett* **583**, 2581-2586 (2009).
- Lüthi, D., Günzel, D., McGuigan, J.A. Mg-ATP binding: its modification by spermine, the relevance to cytosolic Mg²⁺ buffering, changes in the intracellular ionized Mg²⁺ concentration and the estimation of Mg²⁺ by 31P-NMR. *Exp Physiol* **84**, 231-252 (1999).
- Lutsenko, S., LeShane, E.S., Shinde, U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys* **463**, 134-148 (2007).

- Machado, R.D., Koehler, R., Glissmeyer, E., Veal, C., Suntharalingam, J., Kim, M., Carlquist, J., Town, M., Elliott, C.G., Hoeper, M., Fijalkowska, A., Kurzyna, M., Thomson, J.R., Gibbs, S.R., Wilkins, M.R., Seeger, W., Morrell, N.W., Gruenig, E., Trembath, R.C., Janssen, B. Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 793-797 (2006).
- MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B* **102**, 3586-3616 (1998).
- MacLean, M.R., Herve, P., Eddahibi, S., Adnot, S. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol* **131**, 161-168 (2000).
- MacLean, M.R., Deuchar, G.A., Hicks, M.N., Morecroft, I., Shen, S., Sheward, J., Colston, J., Loughlin, L., Nilsen, M., Dempsey, Y., Harmar, A. Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **109**, 2150-2155 (2004).
- MacLennan, D.H., Green, N.M. Structural biology. Pumping ions. *Nature* **405**, 633-634 (2000).
- Magnani, F., Tate, C., Wynne, S., Williams, C., Haase, J. Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin. *J Biol Chem* **279**, 38770-38778 (2004).
- Manivet, P., Mouillet-Richard, S., Callebert, J., Nebigil, C.G., Maroteaux, L., Hosoda, S., Kellermann, O., Launay, J.M. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* **275**, 9324-9331 (2000).
- Manivet, P., Schneider, B., Smith, J.C., Choi, D.S., Maroteaux, L., Kellermann, O., Launay, J.M. The serotonin binding site of human and murine 5-HT_{2B} receptors: molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **277**, 17170-17178 (2002).
- Manivet, P., Pratuangdejkul, J., Pagan, C., Hercend, C., Launay, J.M. in *Sérotonine, Aspects biologiques et cliniques* pp. 1-12 (coord. O. Spreux-Varoquaux, ed. Lavoisier) (2012).
- Marcos, E., Adnot, S., Pham, M.H., Nosjean, A., Raffestin, B., Hamon, M., Eddahibi, S. Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 487-493 (2003).
- Maurice, P., Guillaume, J., Benleulmi-Chaachoua, A., Daulat, A.M., Kamal, M., Jockers, R. GPCR-interacting proteins, major players of GPCR function. *Adv Pharmacol* **62**, 349-380 (2011).
- McRobb, F.M., Capuano, B., Crosby, I.T., Chalmers, D.K., Yuriev, E. Homology modeling and docking evaluation of aminergic G protein-coupled receptors. *J Chem Inf Model* **50**, 626-637 (2010).
- Metropolis, N., Rosenbluth, A., Rosenbluth, M., Teller, A. Equation of state calculations by fast computing machines. *J Chem Phys* **21**, 1986-1092 (1953).
- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., Mannoury la Cour, C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 454-464 (2008).
- Milligan, G., Bond, R.A. Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 468-474 (1997).
- Montani, D., Perros, F., Gambaryan, N., Girerd, B., Dorfmüller, P., Price, L.C., Huertas, A., Hammad, H., Lambrecht, B., Simonneau, G., Launay, J.M., Cohen-Kaminsky, S., Humbert,

- M. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 116-123 (2011).
- Morecroft, I., Heeley, R.P., Prentice, H.M., Kirk, A., MacLean, M.R. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br J Pharmacol* **128**, 730-734 (1999).
 - Morecroft, I., Loughlin, L., Nilsen, M., Colston, J., Dempsie, Y., Sheward, J., Harmar, A., MacLean, M.R., Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the serotonin transporter in pulmonary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 539-548 (2005).
 - Morecroft, I., Dempsie, Y., Bader, M., Walther, D.J., Kotnik, K., Loughlin, L., Nilsen, M., MacLean, M.R. Effect of tryptophan hydroxylase 1 deficiency on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Hypertension* **49**, 232-236 (2007).
 - Morgan, C.T., Tsivkovskii, R., Kosinsky, Y.A., Efremov, R.G., Lutsenko, S. The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *J Biol Chem* **279**, 36363-36371 (2004).
 - Morris, G.M., Lim-Wilby, M. in *Molecular Modelling of Proteins* pp. 365-382 (Humana Press, 2008).
 - Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785-2791 (2009).
 - Murthy, N., Selvaraj, S., Cowen, P., Bhagwagar, Z., Riedel, W., Peers, P., Kennedy, J., Sahakian, B., Laruelle, M., Rabiner, E., Grasby, P. Serotonin transporter polymorphisms (SLC6A4 insertion/deletion and rs25531) do not affect the availability of 5-HTT to [11C] DASB binding in the living human brain. *NeuroImage* **52**, 50-54 (2010).
 - Nebigil, C.G., Launay, J.M., Hickel, P., Tournois, C., Maroteaux, L. 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2591-2596 (2000).
 - Nebigil, C.G., Launay, J.M., Hickel, P., Tournois, C., Maroteaux, L. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 9508-9513 (2000).
 - Nebigil, C.G., Jaffré, F., Messaddeq, N., Hickel, P., Monassier, L., Launay, J.M., Maroteaux, L. Overexpression of the Serotonin 5-HT_{2B} Receptor in Heart Leads to Abnormal Mitochondrial Function and Cardiac Hypertrophy. *Circulation* **107**, 3223-3229 (2003).
 - Nebigil, C.G., Etienne, N., Messaddeq, N., Maroteaux, L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB J* **17**, 1373-1375 (2003).
 - Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., Carruba, M.O. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric Oxide. *Science* **299**, 896-899 (2003).
 - Nugent, A.G., McGurck, C., Johnston, G.D. Forearm vascular responses to serotonin are not mediated by products of cyclooxygenase. *Br J Clin Pharmacol* **41**, 241-243 (1996).
 - O'Brien, M., Anthony, J. Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1006-1018 (2005).
 - Olivarez, L., Caggana, M., Pass, K.A., Ferguson, P., Brewer, G.J. Estimate of the frequency of Wilson's disease in the US Caucasian population: a mutation analysis approach. *Ann Hum Genet* **65**, 459-463 (2001).
 - Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745 (2000).

- Pani, P.P., Trogu, E., Vecchi, S., Amato, L. Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database Syst Rev* **12**, CD002950 (2011).
- Parent, F., Bachir, D., Inamo, J., Lionnet, F., Driss, F., Loko, G., Habibi, A., Bennani, S., Savale, L., Adnot, S., Maitre, B., Yaïci, A., Hajji, L., O'Callaghan, D.S., Clerson, P., Girot, R., Galacteros, F., Simonneau, G. A hemodynamic study of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med* **365**, 44-53 (2011).
- Patchornik, G., Goldshleger, R., Karlsh, S.J. The complex ATP-Fe(2+) serves as a specific affinity cleavage reagent in ATP-Mg(2+) sites of Na,K-ATPase: altered ligation of Fe(2+) (Mg(2+)) ions accompanies the E(1)-->E(2) conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11954-11959 (2000).
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Hill, K.P., Gottheil, E., Thornton, C.C., Weinstein, S.P. No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Psychiatr Genet* **12**, 161-164 (2002).
- Patny, A., Desai, P.V., Avery, M.A. Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design. *Curr Med Chem* **13**, 1667-1691 (2006).
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevsek, M., Fink, H., Rupnik, M., Walther, D.J. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol* **7**, e1000229 (2009).
- Pedersen, P.L. Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 327-332 (2002).
- Pietri, M., Schneider, B., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., Kellermann, O. Reactive oxygen species-dependent TNF-alpha converting enzyme activation through stimulation of 5-HT2B and alpha1D autoreceptors in neuronal cells. *FASEB J* **19**, 1078-1087 (2005).
- Porvasnik, S.L., Germain, S., Embury, J., Gannon, K.S., Jacques, V., Murray, J., Byrne, B.J., Shacham, S., Al-Mousily, F. PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **334**, 364-372 (2010).
- Prioleau, C., Visiers, I., Ebersole, B.J., Weinstein, H., Sealfon, S.C. Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT2C receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations. *J Biol Chem* **277**, 36577-36584 (2002).
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H. Crystalline serotonin. *Science* **108**, 329-330 (1948).
- Rashid, M., Manivet, P., Nishio, H., Pratuangdejkul, J., Rajab, M., Ishiguro, M., Launay, J.M., Nagatomo, T. Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT2 antagonist, to human 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci* **73**, 193-207 (2003).
- Rasmussen, S., Choi, H., Fung, J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P., Devree, B., Rosenbaum, D., Thian, F., Kobilka, T., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R., Gellman, S., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W.I., Kobilka, B.K. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-180 (2011).
- Redish, A., Jensen, S., Johnson, A. A unified framework for addiction: vulnerabilities in the decision process. *Behav Brain Sci* **31**, 1-73 (2008).
- Reinstein, J., Jencks, W.P. The binding of ATP and Mg²⁺ to the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum follows a random mechanism. *Biochemistry* **32**, 6632-6642 (1993).

- Robiolio, P.A., Rigolin, V.H., Wilson, J.S., Harrison, J.K., Sanders, L.L., Bashore, T.M., Feldman, J.M. Carcinoid heart disease : correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* **92**, 790-795 (1995).
- Rodriguez-Granillo, A., Sedlak, E., Wittung-Stafshede, P. Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *J Mol Biol* **383**, 1097-1111 (2008).
- Rohl, C., Strauss, C.E., Chivian, D., Baker, D. Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. *Proteins* **55**, 656-677 (2004).
- Rondelet, B., Van Beneden, R., Kerbaul, F., Motte, S., Fesler, P., Mcentee, K., Brimiouille, S., Ketelslegers, J.M., Naeije, R. Expression of the serotonin 1b receptor in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **22**, 408-412 (2003).
- Roth, B.L. Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* **356**, 6-9 (2007).
- Rothman, R.B., Baumann, M.H. Neurochemical mechanisms of phentermine and fenfluramine: Therapeutic and adverse effects. *Drug Dev Res* **51**, 52-65 (2000).
- Ruddell, R.G., Oakley, F., Hussain, Z., Yeung, I., Bryan-Lluka, L.J., Ramm, G.A., Mann, D.A. A Role for Serotonin (5-HT) in Hepatic Stellate Cell Function and Liver Fibrosis. *Am J Pathol* **169**, 861-876 (2006).
- Rudnick, G. Cytoplasmic permeation pathway of neurotransmitter transporters. *Biochemistry* **50**, 7462-7475 (2011).
- Russell, A., Banes, A., Berlin, H., Fink, G.D., Watts, S.W. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor function is enhanced in the Nomega -nitro-L-arginine hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 179-187 (2002).
- Sagui, C., Darden, T.A. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-Range electrostatic effects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 155-179 (1999).
- Sanchez, C., Hyttel, J. Comparison of the effects of Antidepressants and Their Metabolites on Reuptake of Biogenic Amines and on Receptor Binding. *Cell Mol Neurobiol* **19**, 467-489 (1999).
- Sandén, N., Thorlin, T., Blomstrand, F., Persson, P., Hansson, E. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* **36**, 427-434 (2000).
- Sato, K., Webb, S., Tucker, A., Rabinovitch, M., O'Brien, R.F., McMurtry, I.F., Stelzner, T.J. Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am J Respir Crit Care Med* **145**, 793-797 (1992).
- Schaerlinger, B., Hickel, P., Etienne, N., Guesnier, L., Maroteaux, L. Agonist actions of dihydroergotamine at 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors and their possible relevance to antimigraine efficacy. *Br J Pharmacol* **140**, 277-284 (2003).
- Scheerer, P., Park, J., Hildebrand, P., Kim, Y., Krauss, N., Choe, H., Hofmann, K., Ernst, O. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497-502 (2008).
- Schmuck, K., Ullmer, C., Kalkman, H.O., Probst, A., Lübbert, H. Activation of Meningeal 5-HT_{2B} Receptors: An Early Step in the Generation of Migraine Headache? *Eur J Neurosci* **8**, 959-967 (1996).
- Schneider, B., Pietri, M., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., Kellermann, O. Control of bioamine metabolism by 5-HT_{2B} and alpha 1D autoreceptors through reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha signaling in neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* **1091**, 123-141 (2006).

- Schneider, E., Schnell, D., Strasser, A., Dove, S., Seifert, R. Impact of the DRY motif and the missing "Ionic Lock" on constitutive activity and G-Protein coupling of the human histamine H4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **333**, 382-392 (2010).
- Schröder, C., Rudas, T., Boresch, S., Steinhäuser, O. Simulation studies of the protein-water interface. I. Properties at the molecular resolution. *J Chem Phys* **124**, 234907 (2006).
- Sealfon, S.C., Chi, L., Ebersole, B.J., Rodic, V., Zhang, D., Ballesteros, J.A., Weinstein, H., Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem* **270**, 16683-16688 (1995).
- Seeley, S., Covic, L., Jacques, S.L., Sudmeier, J., Baleja, J.D., Kuliopulos, A. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding. *Chem Biol* **10**, 1033-1041 (2003).
- Seifert, R., Wenzel-Seifert, K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **366**, 381-416 (2002).
- Sikander, A., Rana, S., Prasad, K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta* **403**, 47-55 (2009).
- Simonneau, G., Robbins, I., Beghetti, M., Channick, R., Delcroix, M., Denton, C., Elliott, C.G., Gaine, S., Gladwin, M., Jing, Z., Krowka, M., Langleben, D., Nakanishi, N., Souza, R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S43-54 (2009).
- Soh, U.J., Dores, M., Chen, B., Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* **160**, 191-203 (2010).
- Souza, R., Humbert, M., Sztrymf, B., Jais, X., Yaici, A., Le Pavec, J., Parent, F., Herve, P., Soubrier, F., Sitbon, O., Simonneau, G. Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur Respir J* **31**, 343-348 (2008).
- Srinivasan, S., Lubrano-Berthelier, C., Govaerts, C., Picard, F., Santiago, P., Conklin, B.R., Vaisse, C. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest* **114**, 1158-1164 (2004).
- Standfuss, J., Xie, G., Edwards, P., Burghammer, M., Oprian, D.D., Schertler, G.F. Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant. *J Mol Biol* **372**, 38770-38778 (2007).
- Stenmark, K.R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W.J., McMurtry, I.F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1013-1032 (2009).
- Storjohann, L., Holst, B., Schwartz, T.W. A second disulfide bridge from the N-terminal domain to extracellular loop 2 dampens receptor activity in GPR39. *Biochemistry* **47**, 9198-9207 (2008).
- Strasser, A., Wittmann, H.J., Seifert, R. Ligand-specific contribution of the N terminus and E2-loop to pharmacological properties of the histamine H1-receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 783-791 (2008).
- Sztrymf, B., Yaïci, A., Girerd, B., Humbert, M. Genes and pulmonary arterial hypertension. *Respiration* **74**, 123-132 (2007).
- Tanzi, R.E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J.L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D.M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L.M., Devoto, M., Peppercorn, J., Bush, A.I., Sternlieb, I., Pirastu, M., Gusella, J.F., Evgrafov, O., Penchaszadeh, G.K., Honig, B., Edelman, I.S., Soares, M.B., Scheinberg, I.H., Gilliam, T.C. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* **5**, 344-350 (1993).

- Tao, Y.X. Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther* **120**, 129-148 (2008).
- Teitler, M., Herrick-Davis, K., Purohit, A. Constitutive activity of G-protein coupled receptors: emphasis on serotonin receptors. *Curr Top Med Chem* **2**, 529-538 (2002).
- Tharayil, V.S., Wouters, M.M., Stanich, J.E., Roeder, J.L., Lei, S., Beyder, A., Gomez-Pinilla, P.J., Gershon, M.D., Maroteaux, L., Gibbons, S.J., Farrugia, G. Lack of serotonin 5-HT_{2B} receptor alters proliferation and network volume of interstitial cells of Cajal in vivo. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 462-9, e109-10 (2010).
- Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J.M., Kellermann, O. Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **273**, 17498-17503 (1998).
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647-655 (2000).
- Toyoshima, C., Nomura, H., Tsuda, T. Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **432**, 361-368 (2004).
- Tranzer, J.P., Da Prada, M., Pletscher, A. Ultrastructural localization of 5-Hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature* **212**, 1574-1575 (1966).
- Tsapakis, E.M., Gamie, Z., Tran, G.T., Adshead, S., Lampard, A., Mantalaris, A., Tsiridis, E. The adverse skeletal effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur Psychiatry* (2011).
- Tsivkovskii, R., Efremov, R.G., Lutsenko, S. The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B. *J Biol Chem* **278**, 13302-13308 (2003).
- Tsivkovskii, R., Eisses, J.F., Kaplan, J.H., Lutsenko, S. Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem* **277**, 976-983 (2002).
- Tsivkovskii, R., MacArthur, B.C., Lutsenko, S. The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner. *J Biol Chem* **276**, 2234-2242 (2001).
- Tsuda, T., Toyoshima, C. Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase. *EMBO J* **28**, 1782-1791 (2009).
- Twarog, B.M., Page, I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**, 157-161 (1953).
- Udenfriend, S., Weissbach, H. Turnover of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) in Tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* **97**, 748-751 (1958).
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H.O., Lübbert, H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett* **370**, 215-221 (1995).
- Urizar, E., Claeyssen, S., Deupí, X., Govaerts, C., Costagliola, S., Vassart, G., Pardo, L. An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* **280**, 17135-17141 (2005).
- Van Der Kamp, M., Shaw, K., Woods, C., Mulholland, A. Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. *J R Soc Interface* **5**, S173-90 (2008).
- Vane, J.R. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother* **12**, 344-349 (1957).
- Vialli, M., Erspamer, V. Cellule enterochromaffini e cellule basigranulose acidofile nei vertebrati. *Z Zellforsch* **19**, 743-773 (1933).
- Vialli, M., Erspamer, V. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Cell Tissue Res* **27**, 81-99 (1937).

- Wainscott, D.B., Cohen, M.L., Schenck, K.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Baez, M., Kursar, J.D., Lucaites, V.L., Nelson, D.L. Pharmacological characteristics of the newly cloned rat 5-hydroxytryptamine_{2F} receptor. *Mol Pharmacol* **43**, 419-426 (1993).
- Walser, R., Kleinschmidt, J., Zerbe, O. A chimeric GPCR model mimicking the ligand binding site of the human Y1 receptor studied by NMR spectroscopy. *Chembiochem* **12**, 1690-1693 (2011).
- Walshe, J.M. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet* **1**, 643-647 (1982).
- Walther, D.J., Peter, J.U., Winter, S., Hölte, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinkel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C.S., Ahnert-Hilger, G., Bader, M., Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* **115**, 851-862 (2003).
- Warden, S., Robling, A., Haney, E., Turner, C., Bliziotes, M. The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of the skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5). *Bone* **46**, 4-12 (2010).
- Warden, S., Robling, A., Sanders, M.S., Bliziotes, M., Turner, C. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* **146**, 685-693 (2005).
- Watts, S.W., Baez, M., Webb, R.C. The 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor and 5-HT receptor signal transduction in mesenteric arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 1103-1113 (1996).
- Watts, S.W., Fink, G.D. 5-HT_{2B}-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am J Physiol* **276**, H944-H952 (1999).
- Watts, S.W., Davis, R.P. 5-Hydroxytryptamine receptors in systemic Hypertension: an arterial Focus. *Cardiovasc Ther* **29**, 54-67 (2011).
- Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T., Case, D.A. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J Comput Chem* **7**, 230-252 (1986).
- Wiggelinkhuizen, M., Tilanus, M., Bollen, C., Houwen, R. Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Aliment Pharmacol Ther* **29**, 947-958 (2009).
- Woimant, F., Chaine, P., Favrole, P., Mikol, J., Chappuis, P. La maladie de Wilson. *Rev Neurol (Paris)* **162**, 773-781 (2006).
- Worth, C.L., Kleinau, G., Krause, G. Comparative sequence and structural analyses of G-protein-coupled receptor crystal structures and implications for molecular models. *PLoS ONE* **4**, e7011 (2009).
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**, 1066-1071 (2010).
- Yadav, V., Ryu, J., Suda, N., Tanaka, K., Gingrich, J., Schutz, G., Glorieux, F., Chiang, C., Zajac, J., Insogna, K. Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. *Cell* **135**, 825-837 (2008).
- Yamada, M., Yasuhara, H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology* **25**, 215-221 (2004).
- Yang, M., Srikiatkhachorn, A., Anthony, M., Chong, B.H. Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT₂ receptor. *Blood Coagul Fibrinolysis* **7**, 127-133 (1996).

- Yao, X.J., Vélez Ruiz, G., Whorton, M.R., Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Deupi, X., Sunahara, R.K., Kobilka, B. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 9501-9506 (2009).
- Yonetani, Y. A severe artifact in simulation of liquid water using a long cut-off length: Appearance of a strange layer structure. *Chem Phys Lett* **406**, 49-53 (2005).
- Zhang, S., Chen, S., Li, W., Guo, X., Zhao, P., Xu, J., Chen, Y., Pan, Q., Liu, X., Zychlinski, D., Lu, H., Tortorella, M.D., Schambach, A., Wang, Y., Pei, D., Esteban, M.A. Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. *Hum Mol Genet* **20**, 3176-3187 (2011).
- Zhang, X., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* **305**, 217 (2004).
- Zingarelli, B., Hake, P.W., Yang, Z., O'Connor, M., Denenberg, A., Wong, H.R. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J* **16**, 327-342 (2002).
- Zolkowska, D., Rothman, R., Baumann, M.H. Amphetamine analogs increase plasma serotonin: implications for cardiac and pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 604-610 (2006).
- Zolkowska, D., Baumann, M.H., Rothman, R.B. Chronic fenfluramine administration increases plasma serotonin (5-hydroxytryptamine) to nontoxic levels. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 791-797 (2008).
- Zopf, D., Das Neves, L.A., Nikula, K., Huang, J., Senese, P., Gralinski, M. C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT2B, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* **670**, 195-203 (2011).

Annexes

Annexe 1 Caractéristiques générales des récepteurs sérotoninergiques (d'après Hannon *et al.*, 2008). Les récepteurs dont l'appellation est en minuscule sont des récepteurs recombinants dont l'expression endogène n'a pu être caractérisé. AC, adénylate cyclase. SNC, système nerveux central.

Nomenclature	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1D}	5-HT _{1E}	5-HT _{1F}
Agonistes sélectifs	8-OH-DPAT	Sumatriptan L 694247	Sumatriptan PNU 109291	–	LY 334370
Antagonistes sélectifs (pK_B)	(±)WAY 100635 (8,7)	GR 55562 (7,4) SB 224289 (8,5) SB 236057 (8,9)	BRL 15572 (7,9)	–	–
Radioligands	[³ H]WAY 100635 [³ H]8-OH-DPAT	[¹²⁵ I]GTI [¹²⁵ I]CYP (rongeur) [³ H]Sumatriptan [³ H]GR 125743	[¹²⁵ I]GTI [³ H]Sumatriptan [³ H]GR 125743	[³ H]5-HT	[¹²⁵ I]LSD [³ H]LY 334370
Effecteur protéine G	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}
Voie de transduction classique	inhibition AC	inhibition AC	inhibition AC	inhibition AC	inhibition AC
Localisation	SNC: neurones du raphé, hippocampe	SNC: striatum, subiculum, substance noire Périphérique: vaisseaux sanguins, crâne	SNC: noyaux dorsaux du raphé.	SNC: Cortex, striatum, Périphérique: plaquettes	cortex, striatum, bulbe olfactif
Pathologies associées	autorécepteur, troubles dépressifs	autorécepteur SNC: comportement agressivité/impulsivité, dépendance à l'alcool Périphérique: migraine	autorécepteur migraine ?	inconnue	inconnue

Annexe 1 (suite)

Nomenclature	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₃	5-HT ₄
Ancienne dénomination	D/5-HT ₂	5-HT _{2F}	5-HT _{1C}	M	–
Agonistes sélectifs	DOI	BW 723C86	Ro 600175	SR 57227 m-CPBG	BIMU 8 RS 67506 ML 10202
Antagonistes sélectifs (pK _B)	Kétansérine (8,5-9,5)	RS-127445 (9,5) SB 200646 (7,5) (non sélectif)	Mésulergine (9,1) SB 242084(9.0) RS 102221(8.4)	Granisetron (10) Ondansetron(8–10) Tropisetron(10–11)	GR 113808 (9-9,5) SB 204070(10.8) RS 100235(11.2)
Radioligands	[¹²⁵ I]DOI [³ H]Kétansérine [³ H]MDL 100907	[³ H]5-HT	[¹²⁵ I]LSD [³ H]Mésulergine	[³ H](S)-Zacopride [³ H]Tropisetron [³ H]Granisetron [³ H]GR 65630 [³ H]LY 278584	[¹²⁵ I]SB 207710 [³ H]GR 113808 [³ H]RS 57639
Effecteur protéine G	G _{q/11}	G _{q/11}	G _{q/11}	-	G _s
Voie de transduction classique	activation PLC	activation PLC	activation PLC	canal ionique	activation AC
Localisation	SNC: cortex Périphérique: vaisseaux sanguins, TGI, plaquettes, muscles lisses	TGI, Cœur	SNC: plexus choroïdes	SNC: noyau du tractus solitaire, area postrema Périphérique: Nerfs périphériques , TGI	colliculi inférieures et supérieures, hippocampe, TGI
Pathologies associées	Maladie de raynaud ?	HTAP, valvulopathies	Obésité	Vomissement post- chimiothérapie, douleur	Syndrome du colon irritable, maladie
Nomenclature	5-ht _{5A}	5-ht _{5B}	5-ht ₆	5-HT ₇	
Ancienne dénomination	5-HT _{5α}	–	–	5-HT _x 5-HT ₁ -like	
Agonistes sélectifs	–	–	–	–	
Antagonistes sélectifs (pK _b)	–	–	Ro 630563 (7,9) SB 271046 (7.8) SB 357134 (8.5)	SB 258719 (7,9) SB 269970 (9,0)	
Radioligands	[¹²⁵ I]LSD [³ H]5-CT	[¹²⁵ I]LSD [³ H]5-CT	[¹²⁵ I]SB 258585 [¹²⁵ I]LSD [³ H]5-HT	[¹²⁵ I]LSD [³ H]SB 269970 [³ H]5-CT [³ H]5-HT	
Effecteur protéine G	G _{i/o}	inconnue	G _s	G _s	
Localisation	hippocampe	inconnue	striatum	hypothalamus, intestin	
Pathologies associées	inconnue	inconnue	inconnue	dysfonction du rythme circadien	

Annexe 2 Exemples de séquences N-terminales de différents RCPG de classe A. Ce tableau illustre la variabilité de la longueur de la partie N-terminale de différents récepteurs sérotoninergiques. Les récepteurs dont la structure 3D a été publiés sont également présentés dans le tableau. β_1 -AR, récepteur β_1 adrénergique ; β_2 -AR, récepteur β_2 adrénergique; A_{2A} R, récepteur A_{2A} de l' adénosine; RhoH, rhodopsine humaine; CXCR4, récepteur de chimiokine CXCR4 ; D_3 R récepteur de la dopamine D3. Les autres récepteurs de classe A qui sont présentés sont ceux pour lesquels une structure 3D est disponible.

RCPG de classe A											
	5-HT _{1A} R	5-HT _{1B} R	5-HT _{2A} R	5-HT _{2B} R	5-HT _{2C} R	β_1 -AR	β_2 -AR	A_{2A} R	RhoH	CXCR4	D_3 R
Longueur N-terminale (aa)	36	49	75	56	52	55	34	7	36	38	32
Identifiant Uniprot	P08908	P28222	P28223	P41595	P28335	P08588	P07550	P29274	P08100	P61073	P35462

Annexe 3 Etude génétique réalisée sur le *SERT* et le *5-HT2B* dans une cohorte de 86 patients atteints d'HTAP. **a.** Polymorphisme retrouvé sur le promoteur (LL, LS, SS) et sur l'intron 2 du gène du SERT (9/12, 10/10, 10/12, 12/12). **b.** Présence ou absence d'un polymorphisme sur la partie N-terminale de gène du récepteur 5-HT_{2B}R selon les différents polymorphismes du transporteur chez les malades HTAP.

a

	LL				LS				SS			
	9/12	10/10	10/12	12/12	9/12	10/10	10/12	12/12	9/12	10/10	10/12	12/12
PAH (n=86)	0 (0)	6 (20)	16 (53,3)	8 (26,8)	1 (2,9)	2 (5,9)	15 (44,1)	16 (47,1)	0 (0)	1 (5,9)	2 (11,8)	14 (82,3)
Témoins (n=81)	1 (3,2)	5 (16,1)	18 (58,1)	7 (28,6)	2 (2,5)	3 (7,5)	23 (57,5)	13 (32,5)	0 (0)	2 (13,3)	6 (40)	7 (46,7)

b

c	SNP 5-HT2B		p (Fisher)
présence du SNP	non	oui	
	62	19	
génotype promoteur	SERT		
ll	27(44%)	4(21%)	0,178
ls	22(35%)	11(58%)	
ss	13(21%)	4(21%)	
génotype promoteur (fréquence allélique)			
l	76(61%)	19(50%)	0,26
s	48(39%)	19(50%)	
génotype intron			
10/10	4(6%)	6(31%)	
10/12	22(36%)	10(53%)	0,01
12/12	36(58%)	3(16%)	
génotype intron (fréquence allélique)			
10	30(24%)	22(58%)	<0,01
12	94 (76%)	16(42%)	

Annexe 4 Résultats de l'étude préliminaire obtenus pour le séquençage du récepteur 5-HT_{2B} dans une population d'addicts.

	WT	Hetero SNP	Hetero R6G	Homo SNP	Homo E42G	Homo R6G
Control (100)	94 (94 %)	2 (2 %)	2 (2 %)		2 (2 %)	
Addicts (73)	61 (80 %)			12 (20 %)		